



**Teresa Amorim
de Faria Cardote**

**Síntese de derivados corrólicos com actividade
antimicrobiana**



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2011

**Teresa Amorim
de Faria Cardote**

Síntese de derivados corrólicos com actividade antimicrobiana

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química com especialidade em Química Orgânica e Produtos Naturais, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria da Graça de Pinho Morgado Silva Neves e da Doutora Maria do Amparo Ferreira Faustino, Professora Associada com Agregação e Professora Auxiliar, respectivamente, do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

o júri

presidente

Prof. Doutor Artur Manuel Soares da Silva
Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Maria da Graça de Pinho Morgado da Silva Neves
Professora Associada com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Maria do Amparo Ferreira Faustino
Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Ana Margarida Gomes da Silva
Investigadora auxiliar do REQUIMTE da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

agradecimentos

À Prof. Doutora Maria da Graça Neves, orientadora deste trabalho, quero agradecer pela orientação científica, pelos preciosos ensinamentos, pela confiança em mim depositada e por toda a disponibilidade e amabilidade demonstradas durante todo o meu percurso académico na Universidade de Aveiro.

À Doutora Maria do Amparo Faustino, orientadora deste trabalho, agradeço pela orientação científica, pelo entusiasmo e empenho constantes no desenvolvimento deste projecto e ainda pela minha inserção no convénio FCT-DAAD-2010-2011 entre o Departamento de Química da Universidade de Aveiro e o Instituto de Física da Universidade Humboldt de Berlim.

Ao Prof. Doutor José Cavaleiro, coordenador do QOPNA, expresso o meu agradecimento pela Bolsa de Investigação concedida no âmbito do trabalho desenvolvido.

Ao Prof. Doutor Artur Silva desejo agradecer por todo o acompanhamento e disponibilidade revelados ao longo deste Mestrado.

À Mestre Eliana Alves agradeço pela disponibilidade e ajuda na realização dos estudos biológicos.

À Doutora Joana Barata, indispensável ao desenvolvimento deste trabalho, desejo expressar o meu mais profundo agradecimento por todo o acompanhamento, pelas suas valiosas sugestões, pelo tempo dispensado e pela sua incansável disponibilidade e preocupação. Quero ainda agradecer pela amizade e pelos bons momentos proporcionados nesta minha passagem pelo QOPNA.

Aos colegas de laboratório deixo uma palavra de agradecimento pelo bom ambiente de trabalho e pela amabilidade com que me acolheram.

Agradeço à minha família e amigos pelo apoio incondicional.

À minha Mãe deixo o mais ternurento obrigado.

palavras-chave

Corróis, metalocorróis substituição nucleófila, aPDT

Resumo

A presente dissertação contempla o estudo de reacções de substituição nucleófila nos anéis pentafluorofenilo do 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrol e do 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrolatogálio(III)(piridina) com vista à obtenção de novos fotossensibilizadores para utilização em Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana. Foram utilizados nucleófilos aromáticos e alifáticos, tendo sido preparados novos derivados corrólicos com ligações do tipo éter, tio-éter e amina.

A análise estrutural dos compostos sintetizados foi realizada com recurso a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear mono e bi-dimensional (RMN de ^1H e ^{19}F , COSY, e NOESY), espectrometria de massa em ESI e MALDI, tendo-se recorrido ainda à espectrofotometria de Ultravioleta-Visível (UV-Visível).

Foram estudadas as propriedades fotofísicas dos novos derivados, tendo sido determinados vários parâmetros tais como: o rendimento quântico de fluorescência, rendimento quântico de geração de oxigénio singuleto, tempo de vida de fluorescência e tempo de vida do estado excitado tripleto.

Foram ainda realizados estudos biológicos preliminares de fotoinactivação da bactéria bioluminescente *Vibrio fischeri* com os compostos que se revelaram mais promissores a nível fotofísico.

Keywords

Corroles, metallocorroles, nucleophilic substitution, aPDT

Abstract

This dissertation reports the synthesis of new corrole derivatives based on nucleophilic substitution reactions involving the pentafluorophenyl moieties of 5,10,15-tris(pentafluorophenyl)corrole and 5,10,15-tris(pentafluorophenyl)corrolategallium(III)(pyridine) aiming to prepare new photosensitizers to be used in Antimicrobial Photodynamic Therapy. Using a variety of aromatic and aliphatic nucleophiles new corrole derivatives with ether, tioether and amine bonds were synthesized.

The structure of the new compounds was determined by several spectroscopical techniques, namely, Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy mono- and bi-dimensional (^1H and ^{19}F NMR, COSY and NOESY), mass spectrometry (MALDI and ESI) and also UV-Visible spectrophotometry. The photophysical properties of the new synthesized compounds were evaluated and some parameters as fluorescence quantum yield, singlet oxygen quantum yield, fluorescence lifetime and triplet excited state lifetime were determined.

Preliminary biological studies were also performed with the most promising compounds in order to evaluate their photoinactivation efficacy in bioluminescent bacteria *Vibrio fischeri*.

Índice

AGRADECIMENTOS	VII
RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
ABREVIATURAS	XIII
CAPÍTULO I	15
PREÂMBULO	17
1. Introdução	19
1.1. Macrociclo corrólico.....	19
1.1.1. História	19
1.1.2. Estrutura e nomenclatura	21
1.1.3. Propriedades gerais.....	23
1.1.4. Reactividade de <i>meso</i> -triarilcorróis	28
1.1.5. Métodos de preparação de <i>meso</i> -triarilcorróis.....	34
1.1.6. Aplicações	39
1.2. Terapia fotodinâmica.....	42
1.2.1. Conceitos básicos	42
1.2.2. Terapia fotodinâmica na inactivação bacteriana	45
1.2.3. Mecanismos citotóxicos: actividade antibacteriana	46
1.3. Características e propriedades dos candidatos a fotossensibilizadores antibacterianos.....	48
CAPÍTULO II	49
2. Preparação de derivados corrólicos	51
2.1. Síntese dos corróis precursores 3 e 4	51
2.1.1. Caracterização estrutural	51
2.2. Funcionalização do 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrol 3 e do 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrolatogálio(III)(piridina) 4 via substituição nucleófila	56
2.2.1. Estudos de funcionalização com nucleófilos aromáticos	56
2.2.1.1. Reacções com a 4-mercaptopiridina	57

2.2.1.1.1. Metilação do 5,10,15-[4-(piridin-4-ilsulfanil)-2,3,5,6-tetrafluorofenil]corrolatogálio(III)(piridina) 19	60
2.2.1.2. Reacções com a 4-hidroxipiridina	60
2.2.1.2.1. Metilação do 5,10,15-tris[4-(piridin-4-iloxi)-2,3,5,6-tetrafluorofenil]corrolatogálio(III)(piridina) 22	64
2.2.1.3. Reacções com a 4-aminopiridina	65
2.2.1.4. Reacções com a 4-aminometilpiridina	67
2.2.1.5. Caracterização estrutural	68
2.2.2. Estudos de funcionalização com nucleófilos de cadeia alifática	76
2.2.2.1. Reacções com álcoois de cadeia alifática	76
2.2.2.1.1. Caracterização estrutural	79
2.2.2.2. Reacções com o éter monometílico de trietilenoglicol (PEG)	85
2.2.2.2.1. Caracterização estrutural	87
2.2.2.3. Reacções com a 3-dimetilamino-1-propilamina	89
2.2.2.3.1. Metilação do 5,10,15-{4-[3-(dimetilamino)propilamino]-2,3,5,6-tetrafluorofenil}corrolatogálio(III) 38	90
2.2.2.3.2. Caracterização estrutural	91
2.2.2.4. Reacções com a <i>N,N</i> -dimetiletanolamina	94
2.3. Conclusões	97
CAPÍTULO III	99
3. Estudos fotofísicos	101
3.1. Propriedades fotofísicas dos corróis precursores 3 e 4	102
3.2. Derivados substituídos com nucleófilos aromáticos	107
3.2.1. Características fotofísicas dos derivados 18 , 19 , 20 , 22 e 23	107
3.3. Derivados substituídos com nucleófilos alifáticos	110
3.3.1. Características fotofísicas dos derivados 29 , 30 , 31 , 32 , 33 e 34	110
3.3.2. Características fotofísicas dos derivados 37 e 38	112

3.4.	Conclusões.....	113
CAPÍTULO IV		115
4.	Estudos biológicos	117
4.1.	Ensaio com a bactéria bioluminescente <i>Vibrio Fischeri</i>	118
4.2.	Estudos de foto-inativação de <i>V. fischeri</i>	120
4.2.1.	Derivados catiónicos 20 e 23	121
4.2.2.	Derivados neutros 19 e 22	125
4.3.	Estudos de foto-estabilidade.....	127
4.4.	Conclusões.....	130
CAPÍTULO V		133
5.	Parte experimental	135
5.1.	Reagentes, solventes e equipamentos.....	135
5.2.	Síntese de 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrol 3	136
5.3.	Síntese de 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrolatogálio(III)(piridina) 4	137
5.4.	Síntese de 5,10,15-tris[4-(piridin-4-ilsulfanil)-2,3,5,6-tetrafluorofenil]corrol 18	138
5.5.	Síntese de 5,10,15-tris[4-(piridin-4-ilsulfanil)-2,3,5,6-tetrafluorofenil]corrolatogálio(III)(piridina) 19	138
5.6.	Síntese de 5,10,15-tris[4-(piridin-4-iloxi)-2,3,5,6-tetrafluorofenil]corrolatogálio(III)(piridina) 22	139
5.7.	Procedimento geral para as reacções de substituição nucleófila com propan-1-ol, pentan-1-ol e octan-1-ol.....	140
5.7.1.	Síntese de 5,10,15-tris(4-propoxi-2,3,5,6-tetrafluorofenil)corrol 29	141
5.7.2.	Síntese de 5,10,15-tris(4-pentiloxi-2,3,5,6-tetrafluorofenil)corrol 31	141
5.7.3.	Síntese de 5,10,15-tris(4-octiloxi-2,3,5,6-tetrafluorofenil)corrol 33	142
5.7.4.	Síntese de 5,10,15-tris(4-propoxi-2,3,5,6-tetrafluorofenil)corrolatogálio(III)(piridina) 30	143
5.7.5.	Síntese de 5,10,15-tris(4-pentiloxi-2,3,5,6-tetrafluorofenil)corrolatogálio(III)(piridina) 32	143
5.7.6.	Síntese de 5,10,15-tris(4-octiloxi-2,3,5,6-tetrafluorofenil)corrolatogálio(III)(piridina) 34	144
5.8.	5,10,15-tris[2,3,5,6-tetrafluoro-4-(3,6,9-trioxadeciloxi)fenil]corrol 35	145

5.9.	5,10,15-tris[2,3,5,6-tetrafluoro-4-(3,6,9-trioxadeciloxy)fenil]corrolatogálio(III)(piridina) 36	146
5.10.	Síntese de 5,10,15-tris{4-[3-(dimetilamino)propilamino]-2,3,5,6-tetrafluorofenil}corrol 37	147
5.11.	Síntese de 5,10,15-tris{4-[3-(dimetilamino)propilamino]-2,3,5,6-tetrafluorofenil}corrolatogálio(III)(piridina) 38	147
5.12.	Procedimento geral para as reacções de metilação.....	148
5.12.1.	Síntese de tri-iodeto de 5,10,15-tris[4-(1-metilpiridínio-4-ilsulfanil)-2,3,5,6-tetrafluorofenil]corrolatogálio(III)(piridina) 20	149
5.12.2.	Síntese de tri-iodeto de 5,10,15-tris[4-(1-metilpiridínio-4-iloxy)-2,3,5,6-tetrafluorofenil]corrolatogálio(III)(piridina) 23	149
5.13.	Ensaio biológico	150
	REFERÊNCIAS	151

Abreviaturas

δ – Desvio químico (em ppm)

ADN – Ácido desoxirribonucleico

aPDT – Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

COSY - Correlação espectroscópica homonuclear, bidimensional, em RMN

DDQ – 5,6-diciano-2,3-dicloro-1,4-benzoquinona

DMAPA – 3-dimetilamino-1-propilamina

DMEA – *N,N*-dimetiletanolamina

DMF – *N,N*-dimetilformamida

DSSCs – Células solares sensibilizadas por corante

ESI - Electrospray

FS - Fotossensibilizador

GaPFC – 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrolatogálio(III)(piridina)

HOMO – Orbital molecular ocupada de maior energia

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada

ISC – Cruzamento inter-sistemas

LUMO – Orbital molecular desocupada de menor energia

m –multiplete

m/z – razão massa/carga

NBS – *N*-bromosuccinimida

NOESY - Espectroscopia de efeito nuclear de Overhauser

PDT – Terapia Fotodinâmica

PBS – solução-tampão de fosfato

PEG – Polietilenoglicol

PFC – 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrol

ppm – partes por milhão

Py - Piridina

qt - quinteto

RLU – Unidades relativas de luminescência

RMN de ^1H – Ressonância Magnética Nuclear de Protão

RMN de ^{19}F – Ressonância Magnética Nuclear de Flúor-19

RNS – Espécies Reactivas de Azoto

ROS – Espécies Reactivas de Oxigénio

rpm – Rotações por minuto

s – singuleto

sex - sexteto

SOD – Superóxido Dismutase

t – tripleto

TFA – Ácido trifluoroacético

TPP – 5,10,15,20-tetrafenilporfirina

UA- unidades arbitrárias

UV-Vis – Espectroscopia de Ultravioleta-Visível

Capítulo I

Introdução

Preâmbulo

Actualmente existe uma grande preocupação com a bio-deterioração do património cultural e histórico que advém do crescimento de microorganismos nestas superfícies. Assim, para salvaguarda do património, surge a necessidade de desenvolver formas de evitar e inibir o desenvolvimento destes biofilmes bacterianos.

Nos dias que correm, uma das metodologias promissoras para a inactivação de microorganismos é a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT). A aPDT tem sido testada com sucesso na desinfecção de superfícies como, por exemplo, em ambiente hospitalar.^[1] Esta técnica exige o desenvolvimento de fotossensibilizadores com características adequadas, nomeadamente, boa geração de oxigénio singuleto, solubilidade em meio fisiológico, capacidade de interacção com as células bacterianas, entre outras.

Neste sentido, o presente trabalho tem como objectivo a preparação de novos derivados corrólicos candidatos a fotossensibilizadores que possam ser utilizados em aPDT. Alguns derivados corrólicos já demonstraram ter características fotofísicas que lhes permitem ser admitidos como fotossensibilizadores.^[2] Os novos derivados sintetizados deverão manter estas características e, por outro lado, deverão apresentar capacidade para serem integrados em revestimentos para superfícies.^[3]

O trabalho desenvolvido envolve o estudo de reacções de substituição nucleófila nos grupos pentafluorofenilo do 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrol (PFC) e do seu complexo de gálio(III) (GaPFC). O estudo das propriedades fotofísicas e da aplicação biológica dos novos derivados sintetizados também é contemplado.

1. Introdução

1.1. Macrociclo corrólico

1.1.1. História

Os compostos tetrapirrólicos são uma classe de moléculas orgânicas, onde se incluem as porfirinas, clorinas, bacterioclorinas, corrinas e corróis, sendo constituídos, tal como o nome indica, por quatro unidades de tipo pirrol. Estes compostos possuem propriedades características e a sua capacidade em estabelecer complexos metálicos confere-lhes extrema importância nos sistemas biológicos. A esta classe pertencem moléculas com importantes funções biológicas como, por exemplo, o grupo heme, presente na hemoglobina do sangue, e as clorofilas, pigmentos fotossintéticos nas plantas.

Relativamente à molécula de corrol, esta terá sido descoberta por acaso em 1960, numa tentativa de preparar sinteticamente uma corrina, o macrociclo constituinte da molécula de vitamina B₁₂.^[4] A vitamina B₁₂ é um nutriente com uma função indispensável na eritropoiese (processo de produção de eritrócitos ou glóbulos vermelhos) e cuja carência está intimamente relacionada com a anemia perniciosa.

De facto, no início do século XX a anemia perniciosa (perturbação hematológica) era uma doença fatal. Como tal, muitos médicos procuravam terapias e tratamento eficientes para esta patologia. Em 1920, George Whipple começou a estudar a influência de determinados alimentos na regeneração do sangue em casos de anemia. O método que utilizava baseava-se em retirar sangue a cães, fornecendo-lhes, de seguida, alimentos de vários tipos. Deste modo, monitorizava quais os alimentos que provocavam uma maior taxa de regeneração do sangue perdido, tendo verificado que o fígado seria o alimento mais eficiente.^[5]

Este trabalho incentivou Minot e Murphy a realizarem experiências no mesmo âmbito. Em 1926 publicam o seu primeiro trabalho nesta área, intitulado “*Treatment of pernicious anaemia with a special diet*”,^[6] onde propõem uma dieta contendo quantidades significativas de fígado – Terapia do Fígado. Concluíram, então, que a doença seria provocada pela ausência de um qualquer nutriente presente neste órgão, visto que os doentes retomavam o seu estado de saúde normal através da ingestão de quantidades consideráveis de fígado.^[5]

Em 1934, o trabalho desenvolvido pelos três investigadores, Whipple, Minot e Murphy, foi merecedor do Prémio Nobel da Fisiologia ou Medicina.^[5]

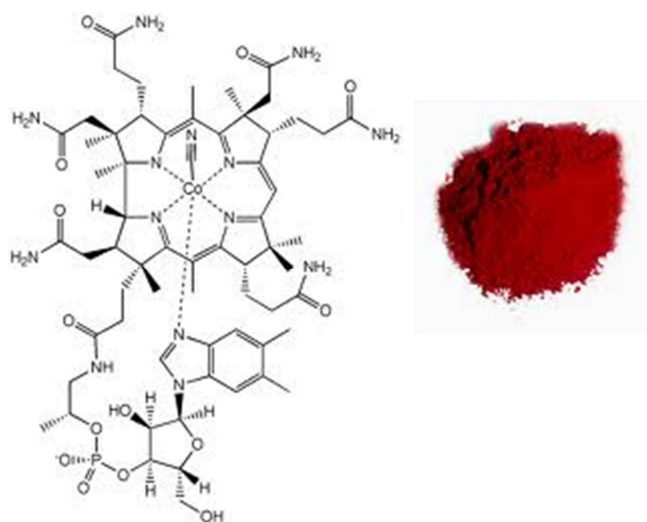


Figura 1 - Estrutura e cristais da Vitamina B₁₂ (ou cianocobalamina).

Descoberto o alimento que poderia evitar a morte dos doentes com anemia perniciosa, os trabalhos de investigação prosseguiram na tentativa de encontrar e isolar o nutriente que estaria na origem das propriedades benígnas do fígado.

Mais tarde, em 1948, Rickes *et al.*^[7] (nos laboratórios da Merck, Estados Unidos da América) e Smith e Parker^[8] (nos laboratórios da Glaxo, Inglaterra), trabalhando de forma independente, isolaram um pigmento vermelho cristalino do fígado (Figura 1) a que chamaram vitamina B₁₂. No ano seguinte, West demonstrou que injeções de vitamina B₁₂, o pigmento isolado, eram extremamente eficazes no tratamento da anemia perniciosa.^[9]

Foi Dorothy Crowfoot-Hodgkin quem, em 1955, permitiu perceber a estrutura desta macromolécula através da cristalografia de raios-X.^[10] Pelo trabalho desenvolvido nesta área, nomeadamente, na determinação da estrutura da vitamina B₁₂ e da estrutura da penicilina, Hodgkin foi galardoada com o Prémio Nobel da Química em 1964.^[11]

Assim, o desafio seguinte seria a síntese laboratorial desta macromolécula, um desafio exigente, atendendo à sua complexa configuração estrutural. É de referir, a título informativo, que a síntese total da vitamina B₁₂ demorou 12 anos a estar completa e envolveu cerca de 100 investigadores de diversas universidades.^[12]

Como já foi referido, numa dessas tentativas de síntese do macrociclo da vitamina B₁₂, Johnson e Price isolaram um macrociclo tetrapirrólico com onze ligações duplas, a que chamaram corrol.^[4] Um ano após esta primeira publicação, Johnson e Kay^[13] corrigem a estrutura inicialmente proposta (**1**) para a de um macrociclo com menos uma ligação dupla (**2**) - Figura 2. Estudos de cristalografia de raios-X do 8,12-

dietil-2,3,7,13,17,18-hexametilcorrol, por Hodgkin e colaboradores em 1971, confirmaram a nova estrutura proposta para a unidade corrolíca.^[14]

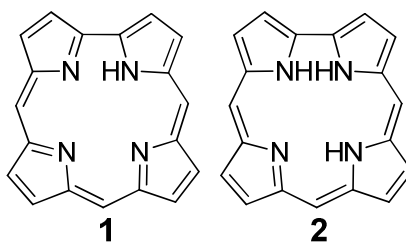


Figura 2 - Estrutura do macrociclo corrolíco inicialmente proposta (1) e estrutura corrigida (2).

Atendendo ao grau de complexidade que a síntese destes compostos envolve, a química dos corróis estagnou durante várias décadas. Porém, perante o aparecimento quase simultâneo de dois métodos simples, em 1999, para preparar *meso*-triarilcorróis,^[15] estes têm vindo a merecer uma crescente atenção por parte da comunidade científica. As suas características peculiares bem como as suas inúmeras aplicações explicam o grande número de publicações que têm surgido nesta área. A título de exemplo, a média de artigos publicados passou de 4 por ano na década de 90 para cerca de 38 por ano na primeira década do século XXI.

1.1.2. Estrutura e nomenclatura

A estrutura do macrociclo corrolíco é idêntica à da corrina, no que diz respeito à contracção do macrociclo, mas apresenta uma conjugação completa como as porfirinas. Deste modo, pode ser considerada uma estrutura intermédia entre esses dois macrociclos - Figura 3.

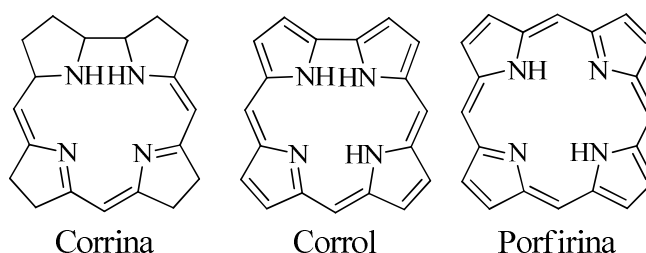
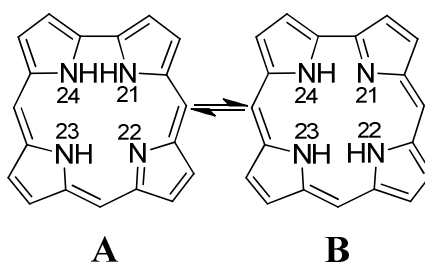


Figura 3 - Estruturas de macrociclo do tipo corrina, corrol e porfirina.

O sistema corrolíco é um sistema constituído por dez pares de electrões dos quais apenas nove contribuem para o carácter aromático. O interior do macrociclo é preenchido por três átomos de azoto de tipo amino e um de tipo imino.

Inicialmente foi sugerido, por Dyke e colaboradores^[16] em 1971, que neste anel a ligação dupla da imina estaria localizada preferencialmente no átomo de azoto 22 (Estrutura **A** - Esquema 1). Porém, Gosh e Jynge, em 1997,^[17] sugeriram a existência de dois tautómeros (Estrutura **B** - Esquema 1) e determinaram, através do cálculo das energias moleculares, que não existe uma diferença energética significativa (cerca de 2-7 kcal·mol⁻¹) entre as duas estruturas. Os mesmos autores sugeriram que a presença de pontes de hidrogénio do tipo N-H...N curtas e extremamente fortes é responsável pelo tautomerismo N-H nalguns casos mais rápido do que o que acontece nas porfirinas.



Esquema 1 - Tautomerismo no macrociclo corrólico.

O tautomerismo NH é um processo bem conhecido nas porfirinas e também já foi estudado por RMN de ¹H nos corróis. Em ensaios realizados à temperatura ambiente é facilmente assinalável a ressonância dos protões NH (o seu sinal aparece a campos superiores ao sinal de ressonância do TMS) que se apresenta na forma de um singuleto largo, o que se deve ao facto das estruturas dos dois tautómeros não serem equivalentes e à elevada acidez dos protões NH.^[18]

Em 2005, Ding e colaboradores^[19] isolaram cristais do 5,10,15-trifenilcorrol e do 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrol que, estudos de cristalografia de raios-X, provaram ser dos dois tautómeros possíveis (os protões NH internos são claramente atribuídos a diferentes átomos de azoto).

Em relação à nomenclatura dos corróis, a IUPAC estabeleceu que deveria ser análoga à das porfirinas. Consequentemente, a numeração dos dois macrociclos terá que ser idêntica.

Assim, e de acordo com a Figura 4, os átomos de carbono são numerados de um a dezanove e aos átomos de azoto internos atribui-se a numeração de vinte e um a vinte e quatro. Repare-se que a ausência do átomo de carbono C20 nos corróis (relativamente às porfirinas) não influencia a numeração dos átomos de azoto para que se mantenha a analogia com as porfirinas. Os quatro anéis pirrólicos do corrol são designados por A, B, C e D, de acordo com o que se apresenta na Figura 5.

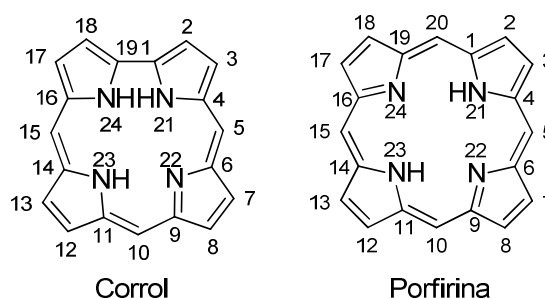


Figura 4 – Numeração do corrol e da porfirina proposta pela IUPAC.^[20]

Resta referir que as posições 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 e 18 podem ser designadas por posições β -pirrólicas e que as posições 5, 10 e 15 podem ser designadas como posições *meso*.

1.1.3. Propriedades gerais

Tal como as porfirinas, os corróis apresentam um plano de coordenação equatorial tetradentado, contudo, é trianiónico, sendo responsável por aspectos notáveis na química de coordenação dos metalocorróis, salientando-se a estabilização de metais em estados de oxidação elevados.^[21] De forma a minimizar o impedimento estérico criado pela presença dos três átomos de hidrogénio no interior do macrociclo, este adopta uma conformação não planar na qual os anéis pirrólicos se movem alternadamente para cima e para baixo. Assim, os átomos de hidrogénio sofrem distorções que os posicionam à mais curta distância de Van der Waals possível que evite colisões, razão pela qual, segundo Gross, se explica a elevada acidez da molécula de corrol.^[21]

Como é possível visualizar na estrutura de raios-X do 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrol **3** apresentada na Figura 5, o protão ligado ao átomo de azoto do anel A é quase perpendicular ao anel pirrólico a que pertence. A diminuição da tensão estérica aquando da desprotonação do corrol é claramente o motivo mais proeminente para a sua elevada acidez, bem como para o aumento da intensidade de fluorescência obtido por formação dos aniões corrólicos.^[18]

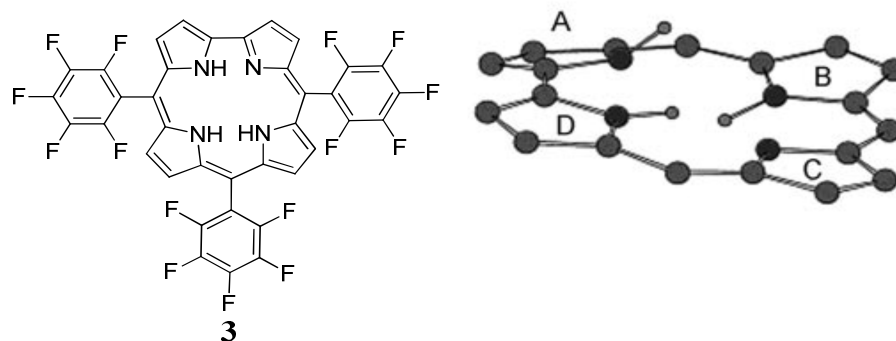
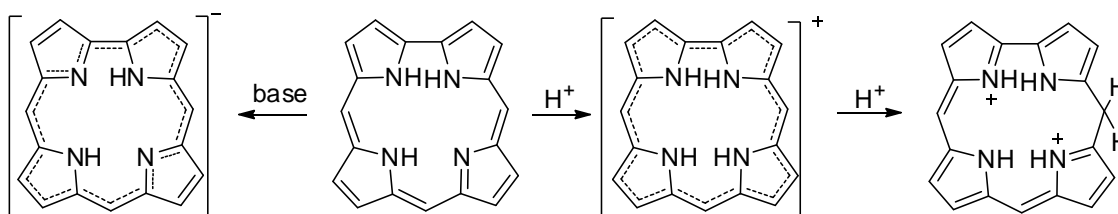


Figura 5 - Estrutura do 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrol, 3, e vista lateral do modelo da estrutura de raios-X do mesmo macrociclo corrólico. ^[18]

Outro aspecto interessante relativamente aos corróis é a capacidade de formarem espécies protonadas estáveis. Por tratamento com um ácido fraco o corrol forma uma espécie monoprotonada, que continua a apresentar forte absorção na zona do visível (protonação num dos NH internos). Contudo, em contacto com ácidos fortes ocorrem alterações significativas nos espectros de absorção dos corróis, nomeadamente o desaparecimento da banda Soret. Por análise espectroscópica de UV-Vis é possível verificar que a protonação ocorre num dos carbonos *meso*, sugerindo a existência de uma espécie dicatiónica,^[22] visto que há interrupção do sistema π conjugado^[23] - Esquema 2.



Esquema 2 - Características ácido-base dos corróis. Esquema adaptado de *The Porphyrin Handbook*, Vol. 2, pág. 201. ^[23]

Assim, uma propriedade única que os corróis apresentam é a sua elevada acidez N-H relativamente às porfirinas. Os corróis tendem a ser desprotonados por bases fracas em solventes apolares ou em solventes polares, como etanol e DMF.^[24]

De acordo com Mahammed *et al.*,^[24] o diferente comportamento ácido-base entre corróis e porfirinas pode ser mais facilmente compreendido ignorando as cargas formais e focando-nos apenas no número de protões NH em cada estado. Desta forma, um corrol mono-protonado corresponde a uma porfirina di-protonada, um corrol neutro

corresponde a uma porfirimina mono-protonada e, por fim, um corrol no estado mono-aniónico corresponde a uma porfirimina neutra. No trabalho em questão é proposto que a instabilidade apresentada pelas porfirinas mono-protonadas e pelos corróis neutros seja devida à maior dificuldade, em termos de impedimento estéreo, na introdução do primeiro protão em porfirinas neutras e em corróis mono-aniónicos, respectivamente. Continuando na mesma linha de raciocínio, se no núcleo do corrol existirem 3 protões NH, $[H_3(\text{corrol})]$, não deve haver um impedimento significativo na entrada de um quarto protão, originando $[H_4(\text{corrol})]^+$. Por outro lado, a remoção de um protão da espécie $[H_3(\text{corrol})]$ liberta uma quantidade significativa de energia, razão que, como já foi referido, explica a elevada acidez dos corróis.^[24]

Os corróis caracterizam-se por apresentarem cores bastante intensas. As suas propriedades químicas e espectroscópicas revelam, mais uma vez, uma relação próxima com as porfirinas. Geralmente, os corróis livres apresentam uma forte absorção na zona do ultravioleta-visível (UV-Vis). Na maioria dos casos, os espectros de absorção dos corróis apresentam uma banda intensa perto dos 400 nm,^[25] banda Soret, e três bandas de menor intensidade a comprimentos de onda mais elevados (500-700 nm), denominadas bandas Q.^[22] A intensidade e comprimento de onda destas bandas reflectem, assim como nas porfirinas, a extensa conjugação do anel.

Um aspecto muito importante nestes compostos relaciona-se com o facto do comportamento de absorção e de emissão de luz ser profundamente dependente do solvente em que se encontram - Figura 6.

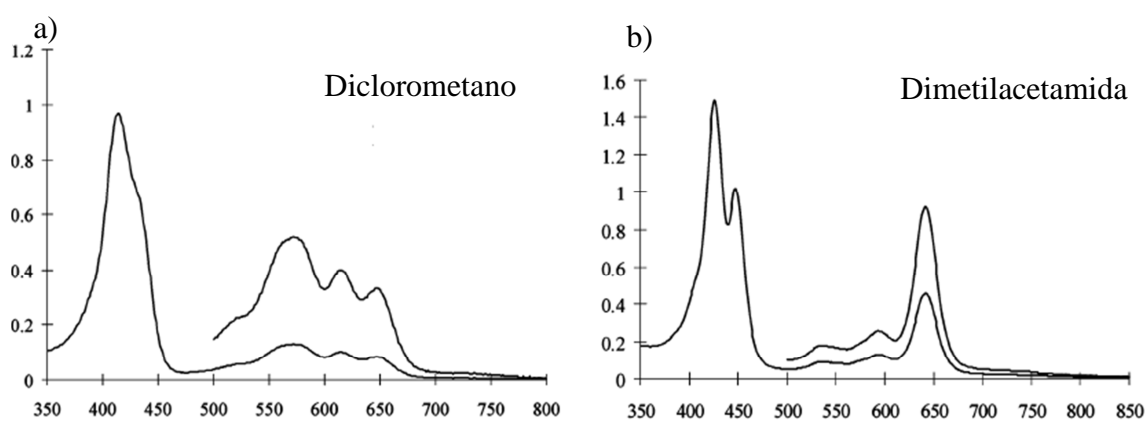


Figura 6 - a) Espectro de absorção do corrol 3 em diclorometano; b) Espectro de absorção do corrol 3 em dimetilacetamida.^[25]

Há três factores que poderão explicar esta dependência: o primeiro é a tautomerização NH, devido à assimetria do anel tetrapirrólico, os dois tautómeros são ligeiramente distintos, no entanto, como ambos são não planares e têm energias semelhantes, a alternância entre os dois é rápida; o segundo factor é a desprotonação do macrociclo em solventes polares (o K_a dos átomos de azoto aumenta devido ao impedimento estéreo e à falta de planaridade do anel),^[24] o que leva à formação da base conjugada do macrociclo com facilidade. Dependendo do pH podem existir as duas espécies em solução (neutra e aniónica), o que influenciará o espectro de absorção, visto que a base conjugada resultante da desprotonação do macrociclo é planar e exibe um espectro de absorção completamente diferente. O terceiro factor prende-se com o estabelecimento de pontes de hidrogénio com um dos grupos NH internos, que pode ocorrer rapidamente com qualquer solvente polar, podendo ser a explicação mais provável para as alterações do espectro de absorção dependentes do solvente.^[25]

Os espectros de absorção dos corróis são dominados por transições $\pi \rightarrow \pi^*$, análogas às das porfirinas, contudo, habitualmente, a banda Soret dos corróis aparece ligeiramente desviada para comprimentos de onda inferiores relativamente às porfirinas correspondentes.^[25]

Embora o sistema electrónico de 18 electrões π seja igual ao das porfirinas, a redução da simetria induz uma alteração na energia das orbitais, o que resulta em transições de menor energia em algumas bandas Q e transições de maior energia na banda Soret. A menor simetria explica também o aumento dos coeficientes de extinção nas bandas Q e a diminuição do mesmo na banda Soret, relativamente às porfirinas.^[25] Por exemplo, relativamente à banda Soret da 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina (416 nm, em diclorometano), a banda Soret do 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrol sofre um desvio hipsocrómico (407 nm, em diclorometano).

Os corróis, de um modo geral, são moléculas fluorescentes, apresentando rendimentos quânticos de fluorescência consideráveis. A intensidade de fluorescência é extremamente dependente do pH, o que pode ser útil para a aplicação de corróis como sensores em sistemas biológicos.^[24] Os espectros de emissão - Figura 7 - caracterizam-se por uma intensa banda de fluorescência perto dos 600 nm com um tempo de vida da ordem dos nano-segundos.^[26] Os corróis **3** e **4** (Figura 8) apresentam um comportamento muito semelhante, notando-se apenas um ligeiro desvio do máximo de emissão do corrol **4** para comprimentos de onda inferiores, relativamente a **3**.

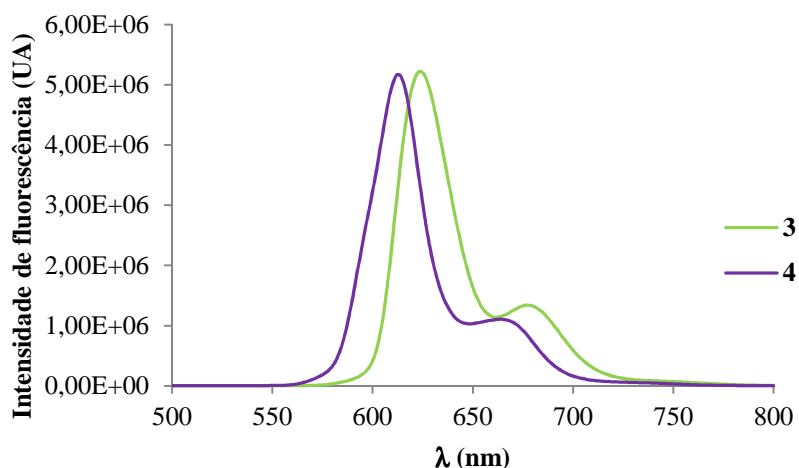


Figura 7 - Espectros de emissão dos corróis 3 e 4 em DMSO.

A primeira investigação sistemática de um conjunto de corróis revelou que estes apresentam uma intensidade de fluorescência superior à das porfirinas análogas. A título de exemplo, o rendimento quântico de fluorescência (ϕ_f) em tolueno para a 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (TPP) é de 0,11 enquanto para o 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrol ($H_3(PFC)$) é de 0,17 e aumenta para 0,35 por desprotonação, originando a espécie $[H_2(PFC)]^-$.^[18] Os tempos de vida de fluorescência, normalmente, variam entre 3,3-3,9 ns.^[25, 27]

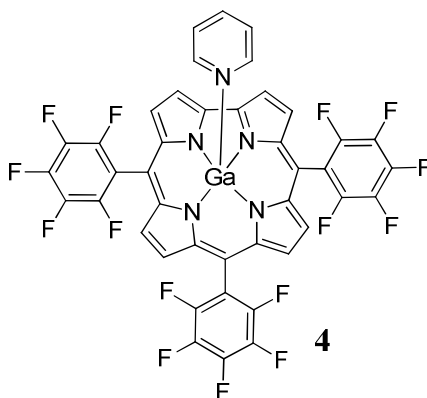


Figura 8 -Estrutura do 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrolato-gálio(III)piridina, 4.

Em relação aos complexos metálicos e comparando os dois sistemas, enquanto a complexação da TPP com o ião zinco(II) reduz o seu rendimento quântico de fluorescência de 0,11 para 0,033 (em tolueno), a complexação do corrol **3** com gálio(III) ($GaPFC$) – Figura 8, estrutura **4** – promove um aumento do rendimento quântico de fluorescência do macrociclo para 0,31, no mesmo solvente.^[27b] É de referir ainda que o rendimento quântico de fluorescência de corróis *N*-substituídos é elevado (0,26-0,30),

permitindo a sua potencial ligação a um suporte sólido sem perda das propriedades fotofísicas características.^[18]

Quanto à espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), o espectro de RMN de ^1H do macrociclo corrólico mostra um sistema aromático diamagnético com uma simetria C_{2v} .^[23] Esta corrente aromática do anel é claramente evidenciada, já que os sinais de ressonância dos prótons dos corróis apresentam desvios significativos, semelhantes aos que ocorrem no caso das porfirinas análogas. Exemplo disto é a forte desprotecção dos prótons dos carbonos *meso* que apresentam sinais de ressonância a cerca de 9 ppm. Os prótons do interior do anel apresentam um sinal de ressonância na forma de singuleto a cerca de -2,86 ppm. A simetria da molécula deve-se à rápida troca dos prótons internos durante o tempo da experiência de RMN, fazendo com que os dois tautómeros sejam magneticamente equivalentes.^[28]

O sistema π dos corróis tem uma densidade electrónica superior à das porfirinas, o que poderá ser benéfico para algumas potenciais aplicações como, por exemplo, em catálise. Contudo, a acção conjunta do oxigénio e de luz pode revelar-se prejudicial no caso dos corróis. Estudos recentes revelam que nalguns casos o macrociclo corrólico não é estável na presença de luz, porém, o 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrol, com os seus substituintes sacadores de electrões, demonstrou ser o corrol mais estável reportado até à data.^[18,29] De uma maneira geral, os derivados corrólicos *meso*-substituídos apresentam maior robustez e são bastante mais estáveis do que os corróis não substituídos.

1.1.4. Reactividade de *meso*-triarilcorróis

Os *meso*-triarilcorróis apresentam três posições passíveis de sofrerem reacções químicas: os grupos *meso*-arilo, os átomos de carbono das posições β da estrutura macrocíclica e os átomos de azoto no interior do macrociclo. De uma maneira geral, a reactividade dos corróis tem vindo a ser testada, de acordo com o que já havia sido feito com as porfirinas.

As reacções no interior do macrociclo caracterizam-se por serem reacções de complexação com iões metálicos em estados de oxidação elevados e reacções de *N*-substituição. Neste caso, uma vez que os dois tautómeros não são idênticos, a substituição de um dos prótons NH internos leva à formação de dois isómeros distintos.^[30]

No que diz respeito às reacções de complexação os corróis demonstraram excelentes propriedades como quelantes e, pelo menos, vinte e dois iões metálicos^[31] já foram introduzidos no interior do macrociclo. No entanto, o número de metais coordenados tende a aumentar. A capacidade do interior do corrol estabilizar iões metálicos em estados de oxidação elevados é um dos aspectos que torna a química de coordenação dos corróis um campo de bastante interesse.^[23] Sendo um macrociclo trianiónico com uma cavidade pequena, o corrol tem a capacidade de estabilizar iões metálicos com pequenos raios iónicos e em estados de oxidação elevados, sendo +3 o número de oxidação mais estável dos iões metálicos presentes nos metalocorróis (mais uma carga positiva que no caso das porfirinas).^[28] Apesar do número de coordenação mais comum para qualquer complexo metálico ser seis, a afinidade dos complexos corrol-metal para um sexto ligando é surpreendentemente baixa. De um modo geral, os corróis adoptam um número de coordenação cinco devido à disposição do ião metálico coordenado fora do plano definido pelos quatro átomos de azoto, o que beneficia tanto o macrociclo como o ião metálico. O corrol trianiónico cede electrões σ e induz uma ligação forte, o que diminui a acidez de Lewis do ião metálico coordenado, diminuindo também a sua afinidade para um sexto ligando, o que acontece nalguns ambientes de coordenação. As ligações covalentes metal-azoto evitam a hidrólise do ião metálico.^[18]

O complexo de gálio(III) do 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrol (Figura 8, corrol **4**), facilmente obtido por refluxo do corrol **3** em piridina com um excesso de cloreto de gálio (GaCl_3),^[27b] é uma das moléculas precursoras utilizadas no trabalho experimental desenvolvido. De acordo com estudos de raios-X os corrolatos de gálio(III) cristalizam na forma de complexo mono-piridínico - Figura 9.

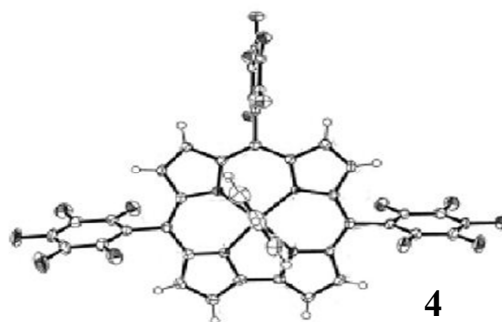


Figura 9 – Estrutura cristalográfica de raios-X do corrol **4.**^[31]

Contrariamente à literatura existente relativa à estabilização de iões metálicos em estados de oxidação elevados por parte dos corróis,^[27b] o número de publicações

referentes à estabilização de iões metálicos em estados de oxidação baixos é muito reduzido. Contudo, estes complexos são bastante reactivos e apresentam características únicas no que diz respeito à activação de moléculas pequenas (catálise), relativamente aos análogos porfirínicos.^[31-32]

A possibilidade de reacção nas posições β -pirrólicas nos *meso*-triarylcorróis permite modificações relativamente simples do esqueleto carbonado do macrociclo. Este tipo de reacção foi demonstrado, pela primeira vez, através da bromação de todas as posições β -pirrólicas do 5,10,15-trifenilcorrol. Foram realizados dois estudos, um por Paolesse^[33] que usou NBS no corrol livre, seguindo-se a complexação com acetato de cobalto(II) e trifenilfosfina, e outro desenvolvido por Gross,^[34] onde usou Br₂ na bromação de um complexo de manganésio(III).

No macrociclo corrólico ocorre substituição selectiva dos protões β -pirrólicos do 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrol quando sujeitos a condições de nitração, hidroformilação e clorossulfonação, como demonstraram Gross e colaboradores.^[35] A reacção do 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrol com um excesso de ácido clorossulfónico é altamente selectiva, originando o corrol substituído com grupos clorossulfonilo nas posições 2 e 17 com um rendimento elevado e apenas quantidades vestigiais do corrol substituído nas posições 3 e 17, sem a obtenção de quaisquer outros produtos.^[18] Segundo Gross, este fenómeno pode estar relacionado com a diferença electrónica entre os átomos de carbono envolvidos na ligação directa pirrol-pirrol (anéis A e D) e os outros átomos de carbono dos anéis B e C.

Vários autores demonstraram também a eficiência da formilação de Vilsmeier no que diz respeito à funcionalização de corróis nas posições *meso* e β .^[35-36] Contudo, a funcionalização nas posições β mostrou-se mais eficaz em *meso*-triarylcorróis complexados com gálio(III) do que em *meso*-triarylcorróis livres. Note-se ainda que as condições de formilação são mais suaves para os corróis do que para porfirinas.^[37]

As orbitais π dos corróis encontram-se em estados de energia mais elevados do que as das porfirinas, o que é consistente com o facto de os corróis sofrerem reacções de substituição electrófila em condições mais amenas do que estas.

No que diz respeito à nitração, o primeiro estudo foi realizado no corrol **4**. Foram estudadas várias condições reaccionais e, dependendo das mesmas, foram obtidos os corróis mono-substituídos, bis-substituídos e tris-substituídos com grupos nitro. Em todos os casos o produto foi obtido como um único isómero, ou seja, no caso

da mono-substituição foi obtido apenas um dos quatro isómeros possíveis (substituição em C3); no caso da bis-substituição foi obtido apenas um dos 16 isómeros possíveis (substituições em C3 e C17) e no caso da tris-substituição foi obtido apenas um dos 28 isómeros possíveis (substituições em C3, C17 e C18). Estes dados foram confirmados por cristalografia de raios-X e revelam a selectividade desta reacção nos corróis.^[35]

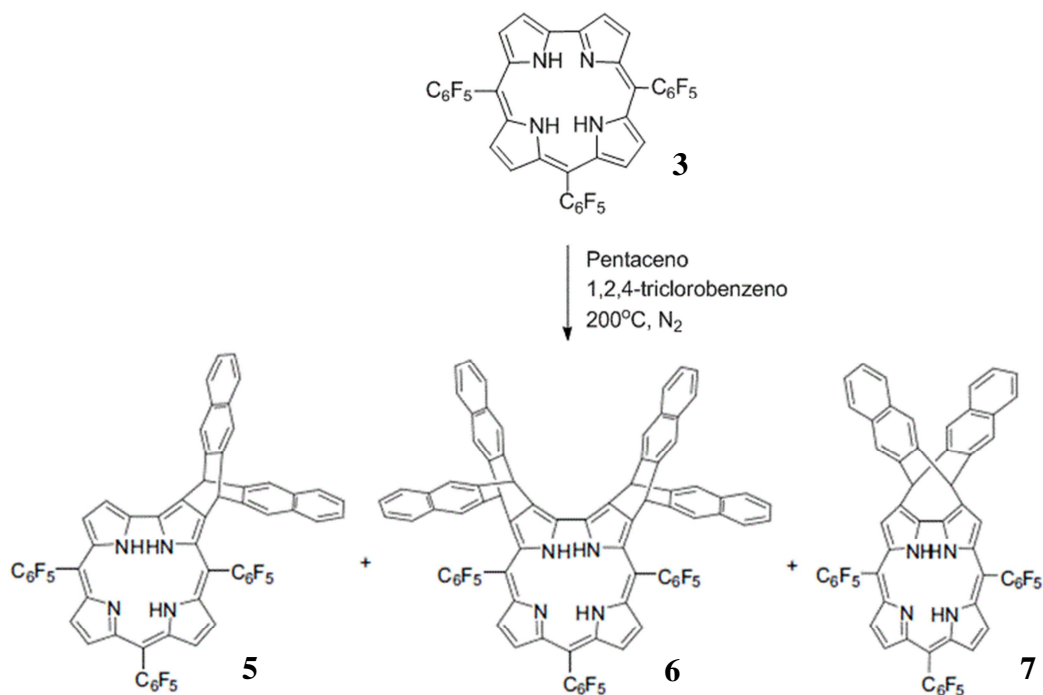
Estudos de substituição electrófila realizados por vários autores permitiram concluir que a primeira substituição ocorre sempre em C3 e a segunda ocorre em C17 (nitração) ou em C18 (formilação e clorossulfonação). De acordo com dados cristalográficos, a discrepância entre C2 e C3 está relacionada com efeitos electrónicos, sendo a posição C3 a mais rica em electrões.^[37]

Os complexos metálicos de corróis também sofrem facilmente reacções de substituição electrófila, tais como bromação, formilação e nitração.^[35]

Barata *et al.*,^[38] do grupo de Química Orgânica da Universidade de Aveiro, demonstraram ainda que os anéis A e D do macrociclo corrólico podem participar como dienófilos e dienos em reacções de cicloadição de Diels-Alder e [4+4], respectivamente, com o pentaceno - Esquema 3.

O mesmo grupo estudou ainda a utilização de corrol-carbaldeídos como precursores de íletos azometínicos em reacções de cicloadição 1,3-dipolar com vários dipolarófilos (nomeadamente, quinonas), tendo obtido os respectivos cicloaductos e ainda, num dos casos, um composto em que o resíduo de quinona se encontra fundido com o corrol.^[39]

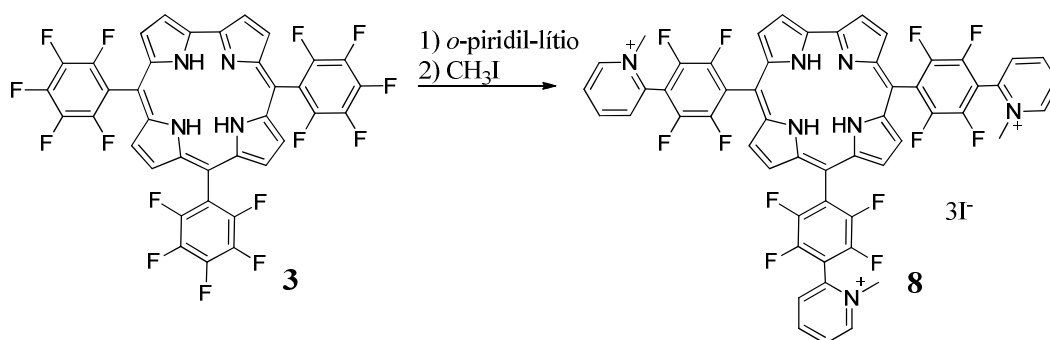
Em 2005, o grupo de Osuka^[40] reportou que a borilação catalisada por irídio do 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrol ocorre regiosselectivamente em C2, contrariamente à selectividade em C3 dos reagentes electrófilos. Este é um bom método para obter dímeros de corróis unidos pelos carbonos β -pirrólicos.



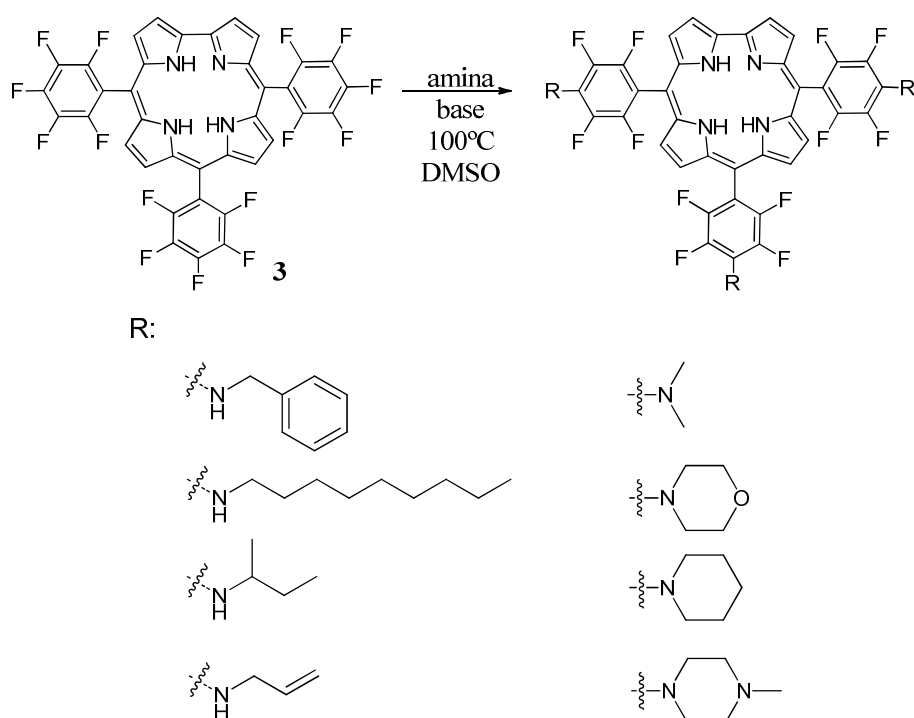
Esquema 3 - Reacção de cicloadição do 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrol com o pentaceno.^[37-38]

Outro tipo de reacção característica a que macrociclo corrólico **3** pode ser sujeito é à reacção de substituição nucleófila do átomo de flúor na posição *para* do grupo pentafluorofenilo. Este comportamento foi demonstrado inicialmente por Gross^[15a] através da reacção com o *orto*-piridil-lítio. A posterior reacção com iodeto de metilo deu origem ao primeiro corrol catiónico reportado, **8** - Esquema 4.

Recentemente, Osuka e colaboradores^[41] publicaram um artigo reportando reacções de substituição nucleófila do corrol **3** com aminas. Estes autores testaram a reactividade com diferentes aminas, usando vários parâmetros reaccionais, o que lhes permitiu desenvolver uma metodologia que pode ser utilizada na funcionalização de derivados corrólicos - Esquema 5. É importante referir que este artigo serviu de base a algumas das reacções desenvolvidas e estudadas no decorrer deste trabalho.



Esquema 4 - Síntese de 5,10,15-tris[4-(1-metilpiridínio-2-il)-2,3,5,6-tetrafluorofenil]corrol, o primeiro corrol catiónico.^[15a]



Esquema 5 – Esquema reaccional para a síntese de derivados corrólicos tris-aminados reportado por Osuka e colaboradores.^[41]

Sendo importante a interacção dos corróis com oxigénio para a utilização destes como fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica é de referir que tanto o estado singuleto como o estado excitado tripleto dos corróis são extremamente reactivos com o oxigénio no estado fundamental (tripleto).

Como já foi referido, os corróis são pouco estáveis sob condições aeróbias e de luminosidade, tendo tendência a originar compostos resultantes da quebra do macrociclo.^[42] No entanto, Barata *et al.*^[43] demonstraram que o 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrol, dependendo do solvente em que se encontra, dimeriza e, por

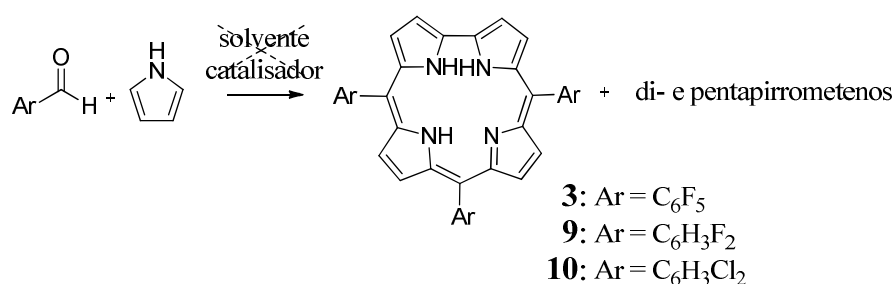
vezes, trimeriza por exposição a luz ambiente. A dependência da luz foi provada para estas reacções de oligomerização, pelo que, deverão envolver mecanismos radiculares.

1.1.5. Métodos de preparação de *meso*-triarylcorróis

Como já foi referido, a primeira síntese de corróis (especificamente, β -alquilcorróis) foi reportada em 1960.^[4] Nos cerca de 40 anos que se seguiram a química dos corróis pouco evoluiu, o que se deveu muito em parte à grande dificuldade de preparação destes compostos. Apesar de terem sido publicadas diversas sínteses de corróis neste intervalo de tempo e, por vezes, até através de procedimentos fáceis, os reagentes utilizados não estavam, na maioria, disponíveis comercialmente.^[44]

Em 1999 surgem as duas publicações abordando métodos simples de preparação de corróis a partir de reagentes comerciais^[15a, 15c] que vêm relançar o estudo e o interesse nestes compostos.

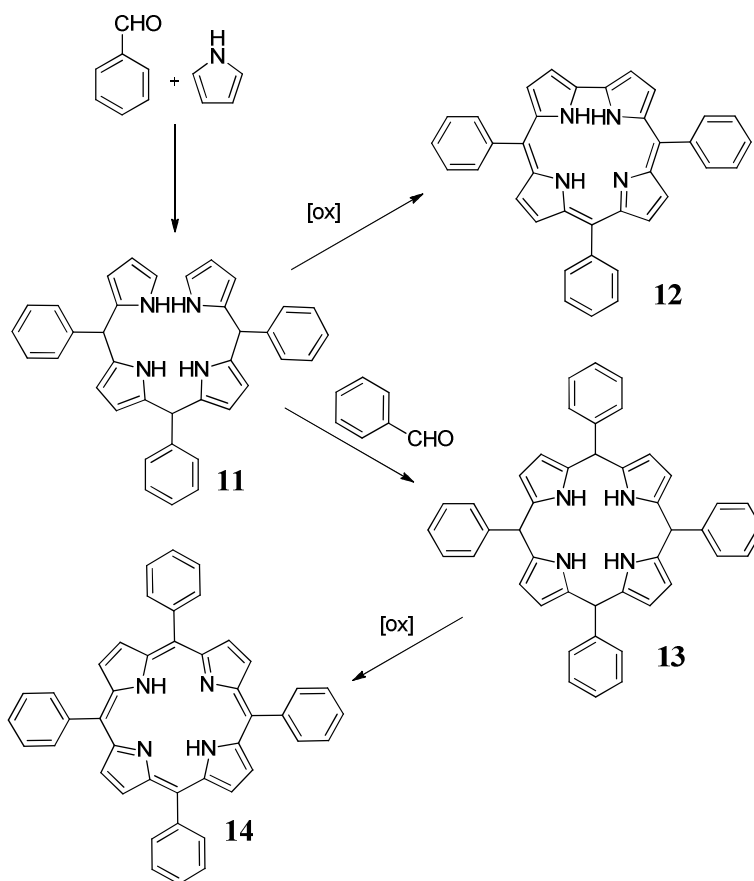
A primeira publicação, por Gross *et al.*,^[15a] explora uma condensação entre pirrol e aldeídos na ausência de solvente. A reacção baseia-se na mistura do pirrol e de um aldeído em quantidades equimolares, na presença de um suporte sólido (florisil, sílica ou alumina básica) e, sendo o meio reaccional aquecido a 100°C durante quatro horas, seguindo-se a oxidação com DDQ. Neste caso, quando o pentafluorobenzaldeído é utilizado, o 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrol é obtido com um rendimento de 11%. Este foi o primeiro *meso*-triarylcorrol sintetizado sem substituintes nas posições β -pirrólicas - Esquema 6.



Esquema 6 – Síntese de corróis com grupos *meso*-substituintes sacadores de electrões publicada por Gross em 1999.^[15a, b]

Não deixa de ser curioso que, neste método, a utilização de benzaldeído origina exclusivamente a porfirina correspondente. Este procedimento revelou-se apenas adequado para o uso de aldeídos com grupos fortemente sacadores de electrões. Pouco tempo depois, o mesmo grupo publica um artigo onde optimizam esta síntese

diminuindo, em particular, o tempo reaccional.^[15b] A segunda publicação, da autoria de Paolesse e colaboradores,^[15c] reporta a síntese do 5,10,15-trifenilcorrol a partir da reacção de Rothmund^[45] modificada. A vantagem da reacção de Rothmund é a preparação de porfirinas e corróis a partir de reagentes simples e sem necessidade de isolar intermediários. Neste caso, a reacção compreende um excesso de pirrol relativamente ao benzaldeído. Os reagentes são colocados em ácido acético a refluxo durante quatro horas. Segue-se o passo de oxidação do macrociclo. Após *work-up* e separação cromatográfica, o *meso*-trifenilcorrol é obtido com 6% de rendimento, bem como a correspondente porfirina, que é obtida com um rendimento semelhante, o que significa que nestas condições a formação do macrociclo corrólico está em competição com a formação do macrociclo porfirínico correspondente - Esquema 7. Note-se que quando a reacção é levada a cabo em ácido propiónico quase não há formação de corrol.

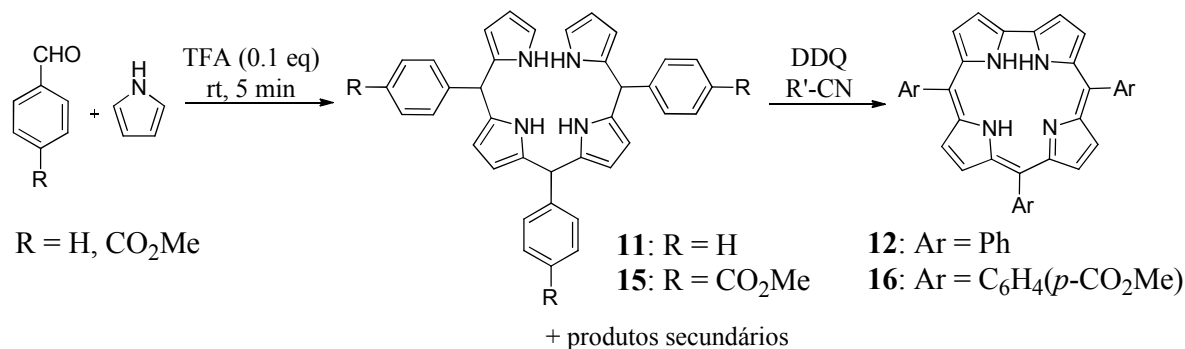


Esquema 7 – Síntese de 5,10,15-trifenilcorrol e 5,10,15,20-tetrafenilporfirina desenvolvida por Paolesse e colaboradores.^[15c, 33]

Este trabalho foi complementado, em 2001, por uma versão actualizada da síntese de *meso*-triarylcorróis usando diferentes aldeídos aromáticos.^[33] Dos dezasseis aldeídos estudados a reacção com o 4-nitrobenzaldeído originou o corrol correspondente

com o maior rendimento reportado até aquela data (22%); a utilização de mesitaldeído, 2,3-dimetoxibenzaldeído e 2,6-diclorobenzaldeído não originaram os corróis *meso*-substituídos correspondentes, o que deverá estar relacionado com factores de impedimento estéreo.

No mesmo ano Lee e colaboradores^[46] reportaram o acoplamento oxidativo de tetrapirrometanos (oligómeros de quatro unidades pirróticas unidas entre si por pontes metínicas) como via para a obtenção exclusiva de corróis *meso*-substituídos com rendimentos superiores a 60%. Este método encontra-se representado no Esquema 8. Inicialmente é sintetizado o tetrapirrometano (Esquema 8 - Estrutura **11** ou **15**) através de uma condensação entre pirrol e aldeído, cujo rendimento de síntese foi melhorado pela utilização de uma proporção de 3:1, respectivamente. Este intermediário sofre, posteriormente, uma ciclização oxidativa com DDQ dando origem ao corrol correspondente. Os autores testaram várias condições reaccionais, nomeadamente, diferentes solventes e a presença de diferentes sais inorgânicos como KCl, NaCl, NH₄Cl e NH₄NO₃. O melhor rendimento (65%) foi obtido combinando a utilização de propionitrilo como solvente e de NH₄NO₃ como aditivo.



Esquema 8 – Síntese de corróis via acoplamento oxidativo de tetrapirrometanos reportada por Lee et. al.^[46]

Em 2003 surge mais uma metodologia, proposta por Collman e Decréau,^[47] que faz uso da radiação microondas para a síntese de *meso*-triarylcorróis e *meso*-tripirimidilcorróis. Segundo os autores, nesta abordagem, além das misturas reaccionais serem bastante mais limpas, os rendimentos de síntese sofrem um aumento de cerca de 30%, na maioria dos casos estudados, quando comparados com os rendimentos das sínteses realizadas sob condições de aquecimento clássico.

Novamente em 2003, Gryko e Koszarna^[48] publicam um trabalho onde apresentam métodos aperfeiçoados de preparação de corróis *meso*-triarylsubstituídos do

tipo A₃, ou seja, os três grupos arilo substituintes nas posições *meso* são iguais. Neste trabalho analisaram todos os parâmetros da reacção de condensação entre as unidades pirrólicas e o aldeído e a posterior oxidação – tempo, temperatura, concentrações, reactividade do aldeído, catalisador, solvente, etc. – e estipularam três conjuntos de condições reaccionais, atendendo à reactividade do aldeído utilizado. Constataram que a adição de pequenas quantidades de ácido trifluoroacético (TFA) puro não seria favorável, uma vez que despoletava processos de oligomerização, e também que quanto maior a reactividade do aldeído, menor a quantidade de ácido que teriam que usar.

Deste estudo concluíram que pequenas quantidades de TFA favorecem a formação dos bilanos (Figura 10), precursores dos corróis; quanto menor a reactividade de um aldeído maior deverá ser a quantidade de pirrol utilizada para obter o corrol desejado em bons rendimentos; o diclorometano é melhor solvente do que o propanonitrilo para o passo de ciclização oxidativa radicalar; sob condições controladas a DDQ não reage com o pirrol excedente, não sendo necessária a sua evaporação. Este método aprofundado da condensação directa de aldeído com pirrol deu origem à síntese de uma série de corróis A₃ com bons rendimentos, partindo de condições reaccionais bastante simples.

Tendo em conta que o grande entrave da reacção de Rothmund para a síntese de corróis é a obtenção concomitante das porfirinas correspondentes e que para que tal não aconteça, é necessário suprimir a síntese do porfirinogénio (precursor das porfirinas, Figura 10) e favorecer a formação do bilano precursor dos corróis (Figura 10), o grupo de Paolesse,^[36b] em 2003, surge com uma publicação onde apresenta um procedimento simples para a síntese de 5,10,15-*meso*-triarilcorróis através de uma reacção de condensação, mas sem formação das *meso*-tetraarilporfirinas correspondentes.

Com este trabalho os autores desenvolveram um novo método *one-pot* que permite a síntese de triarilcorróis com diferentes padrões de substituição nas posições periféricas. O método não é mais do que uma optimização do trabalho já publicado pelos mesmos. Assim, a obtenção de quantidades superiores de corrol relativamente à porfirina correspondente é conseguida desde que a condensação do pirrol e do aldeído oriente a síntese do bilano linear, o que acontece na ausência de solvente e na presença de TFA. Segue-se a diluição da mistura reaccional em diclorometano e posterior oxidação com DDQ.

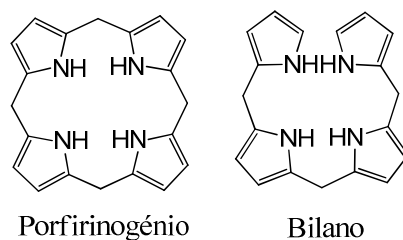


Figura 10 – Estruturas dos precursores das porfirinas e dos corróis, respectivamente, porfirinogénio e bilano.

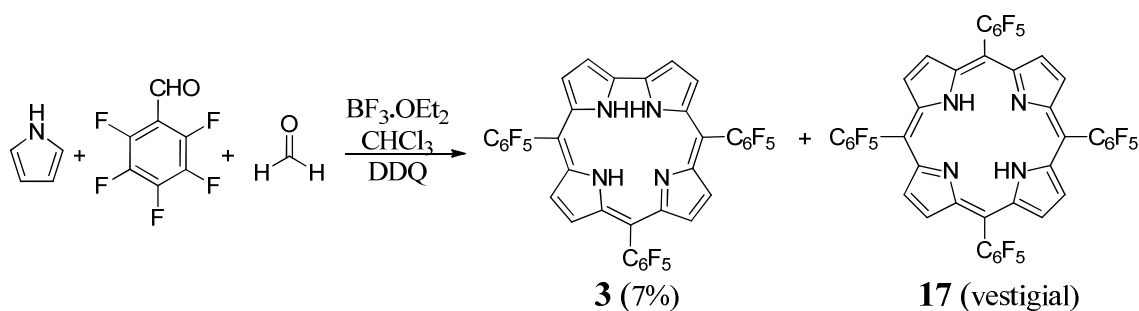
Em 2006 a síntese de corróis volta a surgir num artigo de Gryko e Koszarna,^[49] com um trabalho onde exploram a síntese *one-pot* de *meso*-triarilcorróis *N*-alquilados no átomo de azoto 21. O método consiste na condensação mista de aldeídos, pirrol e pirróis *N*-alquilados.

Os mesmos autores publicam ainda no mesmo ano uma metodologia de síntese de corróis *meso*-substituídos em meio aquoso (mistura metanol:água na presença de HCl).^[50] A optimização dos vários parâmetros com influência no método levou à síntese de quantidades consideráveis de bilano. Este intermediário foi isolado e sujeito a ciclização oxidativa dando origem ao mais elevado rendimento de 5,10,15-trifenilcorrol alguma vez publicado (32%). A eficiência deste método é elevada para aldeídos com grupos dadores de electrões e moderadamente reactivos.^[50]

Em 2008, Chauhan e Kumari reportaram a síntese de 5,10,15-triarilcorróis usando Amberlyst 15 como catalisador.^[51] O Amberlyst 15 é uma resina macroreticular de troca iónica constituída por poliestireno e moléculas de ácido sulfónico. Esta síntese é realizada na ausência de solvente e à temperatura ambiente. Neste estudo, os autores concluíram que a DDQ é o oxidante mais adequado em diclorometano nas reacções à temperatura ambiente e que o Amberlyst 15 é o catalisador mais eficiente na ausência de solvente. As vantagens deste método prendem-se com as condições reaccionais mais amenas, menor formação de produtos secundários e a reutilização do catalisador heterogéneo.

Por fim, surge um novo método em 2010 que consiste numa modificação do método de Lindsey (descrito para a síntese de porfirinas).^[52] Assim, baseia-se na condensação de pirrol, para-formaldeído e pentafluorobenzaldeído sob as condições do método anterior - Esquema 9. Note-se que o papel do para-formaldeído, embora que ainda não muito bem definido, será ajustar a concentração de ácido para favorecer a síntese de bilano ao invés do porfirinogénio (quando não se utiliza o para-formaldeído a

porfirina é formada preferencialmente). Após separação cromatográfica da mistura reaccional o corrol **3** é obtido com um rendimento de 7%.



Esquema 9 – Síntese do corrol **3** reportado por Dogutan *et. al.*^[53]

O método escolhido para a síntese do corrol precursor das reacções estudadas no decorrer deste trabalho foi o reportado por Gryko em 2003.^[48] É um método simples e rápido (a síntese ocorre em apenas 15 minutos), fornece bons rendimentos e a separação do corrol **3** é bastante acessível.

Considerando que no decorrer do trabalho experimental realizado apenas se utilizaram *meso*-triarylcorróis do tipo A_3 , foram apenas apresentados procedimentos sintéticos deste tipo de compostos. Porém, existem publicações de procedimentos sintéticos de *meso*-triarylcorróis do tipo A_2B , isto é, os dois substituintes aromáticos em posições *meso* simetricamente opostas são iguais e o restante é diferente.^[48,54]

Note-se que esta área está em constante desenvolvimento e têm sido publicados vários artigos de revisão no que respeita à preparação de corróis.^[26,36b,55]

1.1.6. Aplicações

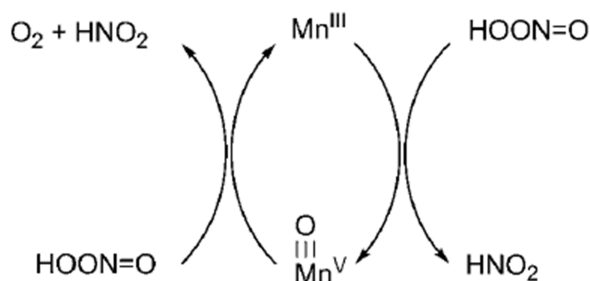
Como já foi referido, a química dos corróis é uma área relativamente recente. Assim, à medida que as propriedades destes compostos vão sendo estudadas, potenciais aplicações vão surgindo. Estas têm-se focado nas suas características únicas, ou seja, manipulação sintética simples, estabilização de iões metálicos de transição em estados de oxidação elevados, elevada acidez NH, propriedades fotofísicas singulares e propriedades catalíticas distintas.^[29]

A primeira aplicação dos corróis surge logo em 1999 ainda antes da publicação dos primeiros métodos de preparação de corróis que serviram de alavanca ao desenvolvimento da química destes compostos. Nesta publicação são apresentados três exemplos da utilização de corróis como catalisadores, provando a sua eficiência na

oxidação de hidrocarbonetos pelo iodosilbenzeno e na ciclopropanação de olefinas por carbenóides.^[56]

Em termos de catálise os corróis já foram estudados em três grandes vertentes reaccionais: reacções de oxidação, reacções de redução e reacções de transferência de grupos.^[29,56] Em particular, os complexos de manganésio(III), ferro(III) e ródio(III) do 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrol já mostraram poder ser utilizados como catalisadores eficientes para várias transformações sintéticas, tais como reacções de epoxidação e reacções de sulfoxidação.

Uma das características mais promissoras dos metalocorróis é o seu grande potencial no que diz respeito à decomposição catalítica de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e de espécies reactivas de azoto (RNS).^[18] Num estudo realizado, os complexos de ferro(III) e manganésio(III) do ácido 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrol-2,17-dissulfónico mostraram-se eficazes como catalisadores na decomposição do peroxinitrito (HOONO), embora apresentando mecanismos catalíticos diferentes. O complexo de ferro(III) actua por isomerização de HOONO a HNO₃ e o mecanismo catalítico do complexo de manganésio(III) encontra-se representado no Esquema 10, sendo HNO₂ o produto final resultante.^[57]



Esquema 10 – Mecanismo catalítico para a decomposição de peroxinitrito catalisada pelo complexo de manganésio(III) do ácido 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrol-2,17-dissulfónico.^[18]

Ainda em 1999, Paolesse *et al.*^[58] sugerem a utilização de corróis em filmes de Langmuir-Blodgett, filmes extremamente finos com um elevado grau de organização estrutural, que podem ter diversas aplicações, por exemplo, como semicondutores, membranas biológicas ou biossensores.^[59]

Em 2004, é sugerida a aplicação de corróis, mais propriamente de corrolatos de cobalto(III), como sensores. Estes compostos demonstraram ter capacidade para ligar monóxido de carbono o que, normalmente, só acontece com os complexos de cobalto(II) sendo, ao mesmo tempo, inertes ao oxigénio.^[60] No trabalho desenvolvido

por Barbe e colaboradores^[60] estes metalocorróis - ligaram selectivamente o monóxido de carbono *versus* azoto e oxigénio moleculares e evidenciaram maior selectividade e afinidade para o ligar do que as porfirinas correspondentes.

Os corróis são óptimos candidatos a ser utilizados como sensores ópticos de pH, uma vez que podem existir em três estados de protonação consoante o pH, e que estes se distinguem por apresentarem intensidades de fluorescência distintas.^[61]

Em 2006 o grupo de Radecki^[62] publica um artigo onde os corróis surgem como compostos analiticamente activos em eléctrodos de membrana líquida, sensíveis ao ácido salicílico e ao salicilato.

Os corróis já foram também evidenciados como corantes em células solares, DSSCs. As DSSCs conseguem converter energia solar em electricidade com eficácia. Alguns derivados de corróis demonstraram ser bastante eficientes como componentes de DSSCs.^[63]

Quando o objectivo está relacionado com aplicações medicinais, os corróis mais adequados são os que exibam propriedades hidrofílicas. O derivado **8** (Esquema 4), cuja síntese já foi apresentada, foi o primeiro corol a ser utilizado em estudos medicinais, tendo demonstrado ser mais eficiente em termos de inibição da proliferação das células endoteliais, progressão do tumor e metástases *in vivo*, relativamente a análogos porfirínicos.^[15a,64]

Recentemente, Haber e colaboradores^[65] demonstraram que o complexo de Fe(III) do ácido 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corol-2,17-dissulfónico se associa a uma subfracção particular de lipoproteínas do soro (HDL2). As lipoproteínas do soro são responsáveis pelo transporte de lípidos na corrente sanguínea, nomeadamente do colesterol. A conjugação espontânea demonstrada pelos autores leva a uma redução significativa das modificações oxidativas nestas lipoproteínas, preservando a sua actividade biológica, crucial em funções cardioprotectivas. Esta investigação abre portas ao desenvolvimento de novas terapias para doenças cardiovasculares.

Outros grupos de investigação utilizaram também o já referido ácido 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corol-2,17-dissulfónico (hidrossolúvel e também anfifílico) e respectivos complexos de gálio(III) e manganésio(III) nos seus estudos, tendo verificado que estes últimos se ligam à albumina sérica, um fenómeno que pode ser utilizado em aplicações medicinais.^[66] Os corróis sulfonados, com carga negativa, não conseguem penetrar a membrana citoplasmática das células, contudo, na presença de proteínas formam espontaneamente agregados corol-proteína que conseguem

atravessar a membrana lipídica e alcançar o interior das células. Este facto é de extrema relevância, na medida em que os corróis se acumulam no citoplasma, o que abre portas a inúmeras aplicações destes compostos a nível medicinal, nomeadamente, como transportadores de fármacos.

Por último, e no enquadramento deste trabalho, apresenta-se a potencial aplicação dos corróis como fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica. Por um lado apresentam propriedades fotofísicas interessantes e chegam a ser, nalguns parâmetros, melhores que os derivados porfirínicos, por outro lado, são compostos novos nunca antes aplicados em PDT nem como antibacterianos.

1.2. Terapia fotodinâmica

1.2.1. Conceitos básicos

A Terapia Fotodinâmica é uma metodologia terapêutica que utiliza compostos que são activados por luz – fotossensibilizadores – e que na presença de oxigénio despoletam uma série de processos que resultam na morte celular.^[67] Embora tenha surgido para o tratamento de lesões cancerígenas e seja utilizada no tratamento da degeneração macular da retina, hoje em dia tem aplicação (ou potencial aplicação) nas mais diversas áreas, como por exemplo, um método antimicrobiano, na desinfecção de sangue, desinfecção de águas ou mesmo de superfícies.

Até ao momento, não existe referência a qualquer aplicação de corróis como fotossensibilizadores (FS) em PDT, o mesmo não se pode dizer das porfirinas, que têm sido amplamente testadas para este efeito.

Atendendo às similaridades entre estas duas famílias de compostos, será feita uma breve referência a alguns derivados porfirínicos estudados para aplicação em PDT. Assim, podem considerar-se dois grupos, sendo que o primeiro inclui as porfirinas naturais e as porfirinas naturais quimicamente modificadas e o segundo é constituído pelas porfirinas sintéticas.

No que diz respeito às porfirinas naturais podemos ter derivados com o padrão da clorofila ou do grupo heme. Entre os derivados da clorofila temos, a título de exemplo, a clorina e₆ (aprovada para uso clínico em PDT) - Figura 11 - e a feoforbide a. Quanto aos derivados do grupo heme destaca-se, por exemplo, o já comercializado Fotofrin® (mistura de oligómeros unidos por ligações éter e éster).^[68]

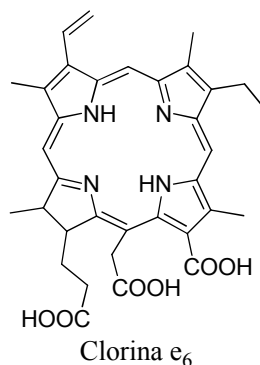


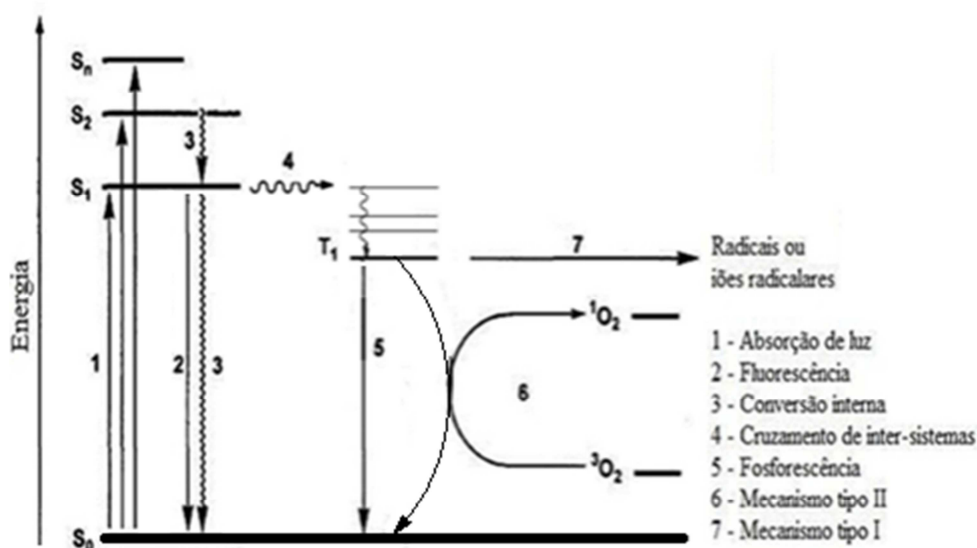
Figura 11 - Estrutura molecular da clorina e₆.

No âmbito das porfirinas sintéticas, os compostos mais estudados têm sido os derivados das *meso*-tetraarilporfirinas, de que é exemplo a 5,10,15,20-tetraquis(4-piridil)porfirina, no entanto, direccionados para a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana aPDT.^[68]

O Esquema 11 apresenta de uma forma muito simples os processos de absorção e transferência de energia característicos da PDT.

No estado fundamental (singuleto) o FS tem dois electrões de *spins* opostos na orbital molecular de mais baixa energia. A absorção de luz de determinado comprimento de onda pelo FS faz com que um dos electrões alcance uma orbital de energia superior, contudo, mantendo o *spin* – 1º estado excitado singuleto do FS, S₁. Esta espécie tem um tempo de vida na ordem dos nano-segundos e pode perder energia por emissão de luz (fluorescência) ou por conversão interna, processo em que a molécula mantém o *spin* mas decai para o estado vibracional mais baixo dissipando energia na forma de calor.

Por outro lado, o estado excitado singuleto do FS pode passar por um processo, designado como cruzamento inter-sistemas, em que o *spin* do electrão excitado é invertido e a espécie passa ao estado excitado tripleto, T₁ (com um tempo de vida superior, na ordem dos micro-segundos). Neste estado, a espécie apresenta *spins* paralelos.^[69]



Esquema 11 – Diagrama de Jablonski simplificado para fotossensibilizadores.^[70]

A partir do estado excitado tripleto a molécula pode relaxar ou por emissão de luz (fosforescência) ou por processos não radiativos. O maior tempo de vida do estado excitado tripleto explica-se pelo facto da perda de energia pela emissão de luz neste estado ser um processo proibido.

Quanto aos processos não radiativos, o FS no estado excitado tripleto pode sofrer reacções do tipo I, transferência electrónica, ou reacções do tipo II, transferência de energia. No primeiro caso, a espécie reage directamente com um substrato (que poderá ser a membrana celular ou uma molécula) transferindo um protão ou electrão, daqui resultando iões radicalares que podem, por sua vez, reagir com o oxigénio, dando origem a espécies citotóxicas (ROS) como o radical hidroxilo, anião radical superóxido, entre outras. O segundo mecanismo, do tipo II, contempla reacções de transferência de energia do estado excitado tripleto do FS para o estado fundamental tripleto do oxigénio molecular (que passa ao estado excitado singuleto).^[69] Forma-se oxigénio singuleto, ¹O₂, uma espécie extraordinariamente reactiva com uma capacidade extrema para oxidar biomoléculas e provocar a morte celular.^[71] Durante este processo o FS pode ser regenerado, actuando, no fundo, como um catalisador, e a partir de uma só molécula de FS várias moléculas de ¹O₂ podem ser geradas, desde que haja luz e oxigénio molecular no meio.^[72] Os dois mecanismos reaccionais podem ocorrer em simultâneo e a razão entre os dois depende do tipo de fotossensibilizador, concentração de substrato e oxigénio.

A diferença energética entre o oxigénio singuleto e o oxigénio no estado tripleto são $94,3 \text{ kJ.mol}^{-1}$ e corresponde a uma transição a cerca de 1270 nm (fosforescência). Esta transição é severamente proibida na molécula isolada devido a regras de spin, simetria e emparelhamento, ou seja, é altamente improvável que ocorra a excitação directa do estado tripleto ao estado singuleto do oxigénio molecular por acção de luz.^[73]

1.2.2. Terapia fotodinâmica na inactivação bacteriana

O uso regular de antibióticos para combater infecções microbianas tem vindo a resultar num aumento massivo de resistência a estes fármacos por parte dos microorganismos, portanto, nos últimos anos temos assistido à emergência e rápida disseminação de estirpes resistentes a fármacos. Actualmente este é um grande problema do ponto de vista clínico e ambiental. Deste modo, é fulcral o desenvolvimento de novas terapêuticas eficientes com diferentes modos de acção.

É neste contexto que surge a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT). Esta metodologia baseia-se nos conceitos subjacentes à PDT, porém é adaptada e exclusivamente dirigida à inactivação de microorganismos.

No caso específico deste trabalho, o desenvolvimento de novos derivados corrólicos com potencial acção como fotossensibilizadores tem como objectivo a aplicação ambiental, mais propriamente, a sua aplicação como aditivos em tintas e/ou revestimentos, com vista à protecção e desinfectação de superfícies.

A grande vantagem da aPDT é a improbabilidade dos microorganismos desenvolverem mecanismos de resistência a este tipo de terapia, atendendo ao modo de acção e visto que não há um alvo específico na célula. Acresce ainda o facto de o FS não ter que se acumular no interior da célula. Sendo as paredes celulares e as membranas os constituintes maioritariamente afectados, a adesão específica é suficiente para a destruição da célula induzida pela luz.^[74] Desta forma, não há possibilidade dos microorganismos inibirem o *uptake*, aumentarem a desintoxicação metabólica ou aumentarem o transporte do FS para o exterior, uma vez que este não se encontra no interior das células.^[75] A aPDT é, pois, um método não antibiótico, sendo uma possível alternativa aos métodos terapêuticos tradicionais, tendo provado ser eficiente *in vitro* contra bactérias, vírus, fungos e protozoários.^[68]

Deve ainda dizer-se que algumas porfirinas catiónicas sintéticas demonstraram ser capazes de inactivar eficientemente *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*,

Yersinia enterocolitica, *Deinococcus radiodurans*, *Mycobacterium smegmatis* e *Staphylococcus aureus* em estudos *in vitro*.^[76] Alguns estudos *in vivo* envolvendo derivados porfirínicos também já demonstraram a sua eficácia como fotossensibilizadores em aPDT na inativação de microorganismos.^[77]

1.2.3. Mecanismos citotóxicos: actividade antibacteriana

Surge, neste contexto, a necessidade de introduzir algumas noções acerca da organização estrutural das bactérias.

As células bacterianas são divididas em dois grupos de acordo com a forma como reagem à coloração de Gram, o que reflecte as suas diferenças a nível morfológico, como é ilustrado na Figura 12. Estas diferenças revelam também um comportamento desigual no que diz respeito a agentes antimicrobianos. Enquanto as bactérias Gram-positivas são muito permeáveis e permitem a entrada de FS, sendo facilmente inactivadas por aPDT, as bactérias Gram-negativas são extremamente impermeáveis a moléculas neutras ou aniónicas, o que se deve à carga negativa na sua superfície, sendo bem mais resistentes à aPDT.^[72]

A vulnerabilidade das bactérias Gram-positivas à aPDT é explicada pela sua fisiologia, a membrana plasmática encontra-se rodeada por uma membrana relativamente porosa de peptidoglicano e moléculas de ácido lipoteicoico.

Quanto às bactérias Gram-negativas, o envelope celular consiste numa membrana citoplasmática (interna) e uma membrana externa, separadas pelo periplasma, constituído por peptidoglicano. A membrana externa estabelece uma barreira física entre a célula e o ambiente exterior e há diversas proteínas que fazem parte da sua constituição (proteínas com função de transporte, enzimática ou estrutural).^[71]

Malik e colaboradores^[78] demonstraram que a administração conjunta do FS neutro ou aniónico e de um agente catiónico, neste caso a polimixina, tornava estes FS eficazes na inactivação desta classe de bactérias.

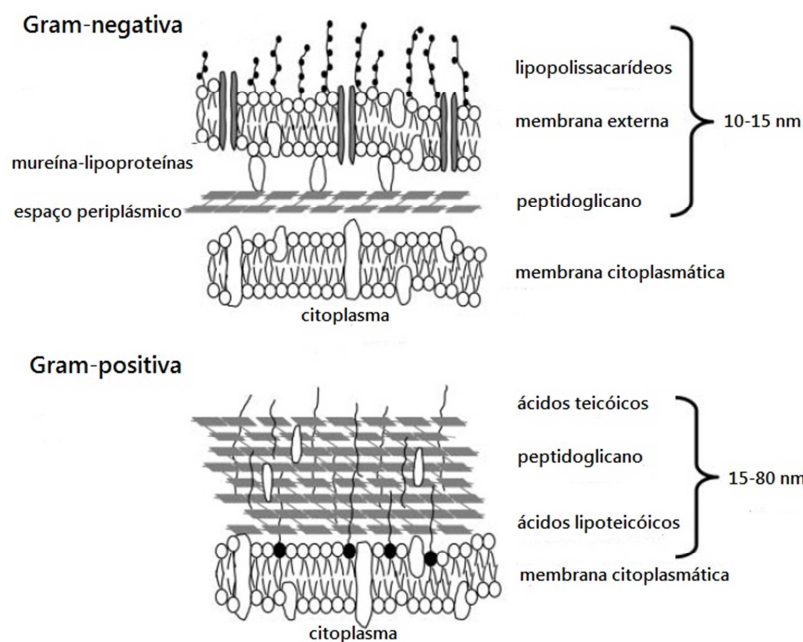


Figura 12 - Diferenças morfológicas entre as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.^[79]

A inativação de bactérias Gram-negativas sem a necessidade da co-administração de um adjuvante foi solucionada pelos grupos de Jori^[80] e Malik,^[78] através da utilização de porfirinas e ftalocianinas catiónicas, respectivamente. Os fotossensibilizadores desenvolvidos mostraram-se activos na foto-inativação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.^[71]

Como referido anteriormente, a actividade fotodinâmica tem efeito, sobretudo, nas paredes e membranas celulares mas também nos envelopes lipídicos e ácidos nucleicos. Os danos provocados a nível das estruturas externas originam a libertação dos constituintes celulares e a desregulação ou inativação dos sistemas de transporte membranares e enzimáticos. Como consequência do efeito fotodinâmico provou-se que ocorriam alterações ao nível de proteínas constituintes da membrana citoplasmática.^[81] Já foram também reportados distúrbios no processo de síntese da parede celular, bem como o aparecimento de uma estrutura multi-lamelar perto do septo de células em divisão e ainda a perda de iões de potássio.^[82] Os danos provocados no ADN das células não podem ser a causa principal para a inativação microbiana através deste método, atendendo a que podem ser reparados por intermédio dos sistemas de reparação do ADN – prova disso foi o estudo feito com *D. radiodurans*, uma espécie conhecida por apresentar um sistema de reparação do ADN extremamente eficaz, e que é facilmente inactivada por aPDT.^[83]

As enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase e peroxidase protegem as células contra algumas ROS, mas não actuam contra o oxigénio singuleto, a espécie mais fundamental no processo de morte celular desencadeado pelo efeito fotodinâmico.^[84] Aliás, o oxigénio singuleto parece ter capacidade para inactivar estas enzimas.^[85]

1.3. Características e propriedades dos candidatos a fotossensibilizadores antibacterianos

Um bom fotossensibilizador tem que preencher determinados requisitos, entre os quais, eficácia na destruição dos agentes patogénicos, selectividade e inibição do novo crescimento de microorganismos e eficiência em meio biológico.

Os fotossensibilizadores deverão absorver luz na zona do vermelho, no entanto, bandas de absorção acima dos 800 nm indicam que os fotões não terão energia suficiente para transferir energia do estado excitado tripleto do FS para o estado fundamental tripleto do oxigénio. Devem também apresentar bandas de absorção intensas, de modo a que para a obtenção do efeito desejável a quantidade de FS possa ser diminuída.

A síntese do FS deve ser simples e os reagentes de partida devem estar disponíveis comercialmente, para que possa ser adaptada à escala industrial. Para além disso, o FS deve ser um composto puro com uma composição constante e deve ser relativamente estável. Idealmente deve ser solúvel em meio aquoso. Não deve apresentar agregação em meio fisiológico, uma vez que os agregados diminuem a eficiência fotodinâmica.

Um bom fotossensibilizador deve, para além disto tudo, apresentar um bom rendimento quântico de geração de oxigénio singuleto.

Visto que a associação do fotossensibilizador com a parede externa ou com a membrana plasmática é um pré-requisito para um processo de inactivação eficiente, será uma mais-valia que a molécula apresente carga positiva para que a adesão seja mais eficaz, nomeadamente na inactivação de estirpes Gram-negativas.^[86]

Capítulo II

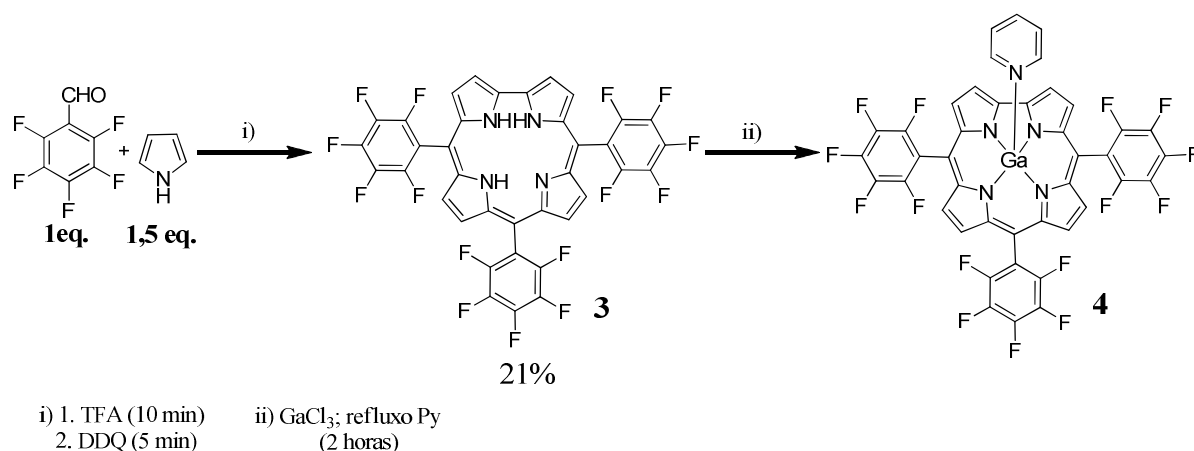
Preparação de derivados corrolícos

2. Preparação de derivados corrólicos

2.1. Síntese dos corróis precursores **3** e **4**

Nas reacções de substituição nucleófila estudadas utilizaram-se como precursores o 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrol **3**, e o 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrolatogálio(III)(piridina) **4**, como já foi referido.

O corrol **3** foi sintetizado de acordo com o procedimento descrito por Gryko,^[48] que consiste em realizar a condensação entre o pentafluorobenzaldeído e o pirrol na presença de ácido trifluoroacético, seguindo-se a oxidação com DDQ. A mistura reaccional foi, de seguida, cromatografada obtendo-se o corrol **3** com um rendimento de 21% - Esquema 12.



Esquema 12 – Esquema reaccional da síntese do 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrol **3** e do 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrolatogálio(III)(piridina) **4**.

O complexo **4** foi obtido, num rendimento quantitativo, por reacção do corrol **3** com cloreto de gálio(III) em refluxo de piridina - Esquema 12.

Os dois compostos, **3** e **4**, foram obtidos puros após cristalização numa mistura de diclorometano e hexano. Os cristais de **3** apresentam uma cor arroxeadada e os cristais de **4** são de cor rosa-esverdeado.

2.1.1. Caracterização estrutural

A caracterização estrutural dos compostos foi realizada com recurso às técnicas de espectroscopia de absorção de UV-Vis, espectroscopia de RMN de ¹H e de ¹⁹F e espectrometria de massa. Para a identificação dos novos derivados foi tida em conta a caracterização estrutural dos seus precursores. Deste modo, será feita uma breve referência às características estruturais e espectroscópicas dos corróis **3** e **4**.

A espectroscopia de absorção de UV-Vis permite, identificar directamente se estamos ou não na presença de um derivado do tipo corrol, dado o aspecto característico dos espectros de visível deste tipo de compostos. A análise dos espectros de UV-Vis permite também a comparação com os espectros de absorção dos corróis precursores, avaliando, desta forma, de que modo a substituição com determinados nucleófilos interfere nas características de absorção. Os espectros de visível dos corróis **3** e **4** apresentam-se na Figura 13.

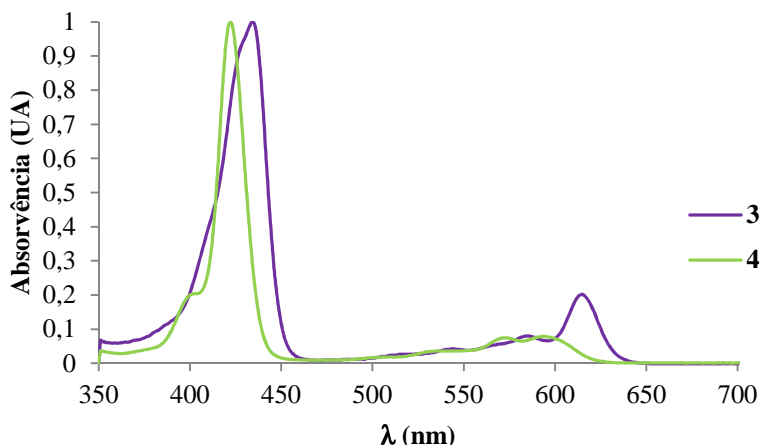


Figura 13 - Espectros de absorção de visível normalizados dos corróis **3** e **4** em DMSO.

Como já foi referido na introdução, os corróis caracterizam-se por apresentarem uma banda de absorção intensa por volta dos 400 nm, designada por banda Soret, e três bandas de menor intensidade entre 500 e 700 nm, designadas por bandas Q. A complexação do corrol **3** com gálio(III) provoca um ligeiro desvio dos máximos de absorção para comprimentos de onda inferiores, ou seja, um efeito hipsocrómico, e o desaparecimento de uma das bandas Q. Como também já foi referido, nos corróis o comportamento de absorção é extremamente dependente do solvente e do pH.

Na Tabela 1 apresentam-se os máximos de absorção bem como os coeficientes de extinção correspondentes para os compostos **3** e **4** em DMSO.

Tabela 1 – Máximos de absorvência e coeficientes de extinção molar (ϵ , $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) dos corróis precursores **3 e **4** em DMSO.**

Precursor	Banda Soret (nm)	log ϵ	Bandas Q (nm)	log ϵ
3	434	5,20	543	4,00
			584	4,20
			614	4,54
4	423	5,42	574	4,39
			592	4,40

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{19}F dos corróis precursores **3** e **4** caracterizam-se por um aspecto simples e os seus sinais são de fácil identificação.

O espectro de RMN de ^1H do corrol **3** - Figura 14 – apresenta quatro sinais gerados pela ressonância dos 8 prótons β -pirrólicos do macrociclo. Os prótons cujo sinal de ressonância, na forma de duplete, aparece a campos mais baixos (δ 9,12 ppm) correspondem aos dois prótons H-2 e H-18 (junto à ponte directa). De seguida, o duplete a δ 8,77 ppm corresponde à ressonância dos prótons H-7 e H-13; os dupletos correspondentes à ressonância de H-3, H-17, H-8 e H-12 aparecem sobrepostos sob a forma de multipeto entre δ 8,60 e 8,57 ppm.

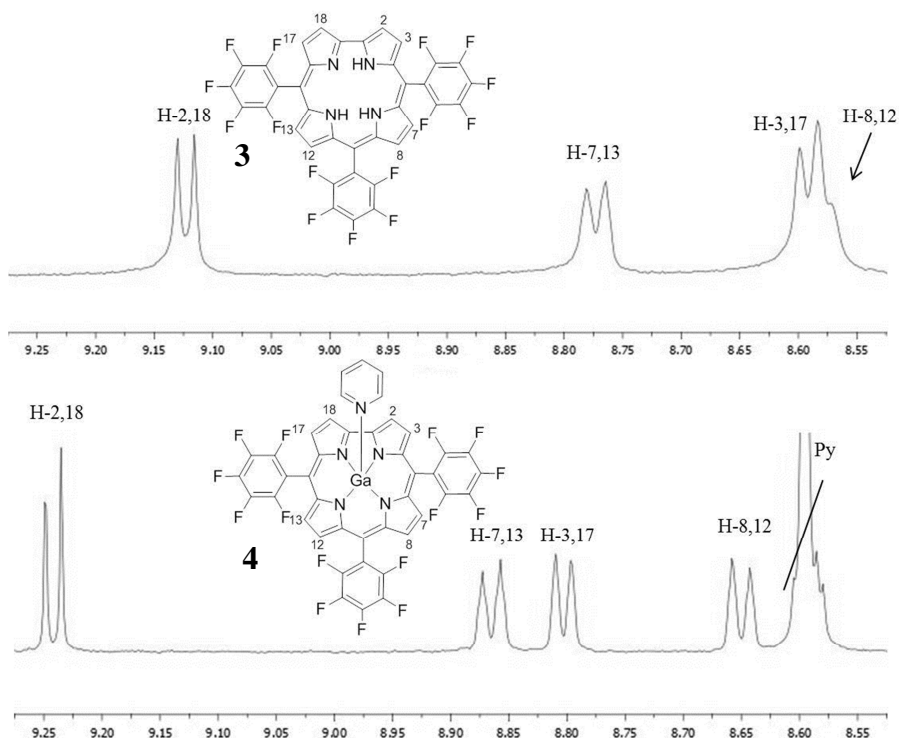


Figura 14 – Espectros de RMN de ^1H dos corróis **3 em CDCl_3 e **4** em CDCl_3 com gotas de $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.**

No caso do espectro de RMN de ^1H do corrol **4** todos os sinais sofrem um deslocamento para campos mais baixos comparativamente com o corrol livre (Figura 14). Assim, os quatro sinais relativos à ressonância dos oito prótons β -pirrólicos surgem como dupletos a δ 9,24 ppm (H-2,18), a δ 8,86 ppm (H-3,17), a δ 8,80 ppm (H-7,13) e a δ 8,65 ppm (H-8,12).

Uma vez que se pretendia sintetizar derivados tris-substituídos nos anéis pentafluorofenilo dos corróis **3** e **4**, os espectros de RMN de ^{19}F dos derivados permitiram não só confirmar as estruturas propostas como foram indispensáveis na identificação da ocorrência de substituição nestes grupos arilo.

Como é visível na Figura 15, nos espectros de RMN de ^{19}F dos corróis **3** e **4** surgem três sinais diferentes correspondentes à ressonância dos núcleos de flúor em posição *orto*, *meta* e *para* relativamente ao macrociclo. Para ambos os casos o sinal de ressonância a campos mais elevados corresponde aos átomos de flúor em posição *meta*; de seguida surge o sinal gerado pela ressonância dos átomos de flúor em posição *para* e, por fim, surge o sinal gerado pela ressonância dos átomos de flúor em posição *orto*.

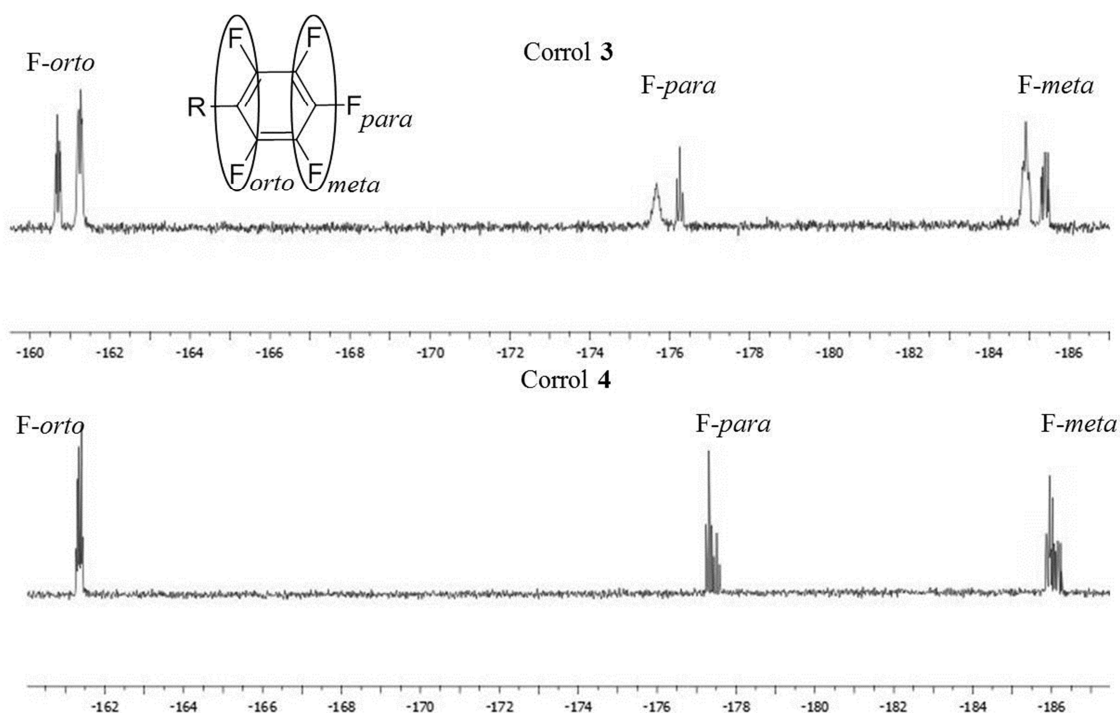


Figura 15 – Espectros de RMN de ^{19}F do corrol **3** em CDCl_3 e **4** em CDCl_3 com gotas de $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

Relativamente ao corrol **3** são gerados dois sinais para cada tipo de átomos de flúor (posições 5 e 15 e posição 10). Note-se ainda que no caso dos átomos de flúor em posição *orto* os mais protegidos são os pertencentes aos grupos pentafluorofenilo nas

posições 5 e 15; no caso dos átomos de flúor em posição *para* e *meta* os mais protegidos são os pertencentes ao grupo pentafluorofenilo na posição 10. Na Tabela 2 apresenta-se um resumo dos sinais relativos à ressonância dos átomos de flúor dos corróis **3** e **4**.

Tabela 2 – Resumo dos sinais gerados pela ressonância dos átomos de flúor nos corróis 3 e 4 em CDCl₃.

Composto	δ (ppm)	Multiplicidade	Flúor
3	-160,7	duplo duplete	<i>orto</i> (2F)
	-161,13	duplo duplete	<i>orto</i> (4F)
	-175,54 a -175,77	multiplete	<i>para</i> (2F)
	-176,25	triplete	<i>para</i> (1F)
	- 184,85 a -184,98	multiplete	<i>meta</i> (4F)
	- 185,30 a -185,48	multiplete	<i>meta</i> (2F)
4	- 162,24 a -161, 46	multiplete	<i>orto</i> (6F)
	- 177,32	triplete	<i>para</i> (2F)
	- 177,51	triplete	<i>para</i> (1F)
	- 185,83 a -186,28	multiplete	<i>meta</i> (6F)

No espectro de RMN de ¹⁹F do corrol **4** - Figura 15 - não é tão perceptível a diferenciação entre átomos de flúor do mesmo tipo pertencentes aos grupos pentafluorofenilo nas posições 5 e 15 e ao grupo pentafluorofenilo na posição 10. Este facto está directamente relacionado com a planaridade alcançada pelo macrociclo através da substituição dos três protões internos pelo ião metálico de gálio(III). No entanto, os sinais gerados pela ressonância dos átomos de flúor de **4** surgem, sensivelmente, na mesma zona de desvio químico a que surgem os sinais de ressonância dos átomos de flúor de **3**, pelo que não serão discutidos.

A espectrometria de massa (EM), uma técnica analítica amplamente utilizada, baseia-se na identificação e análise da razão massa/carga (m/z) de iões em fase gasosa. Desta forma, permitiu confirmar a estrutura proposta para cada derivado. Os corróis **3** e **4** geram iões moleculares com razões m/z de 797 [M+H]⁺ e 863 [M-Py+H]⁺ (MALDI), respectivamente.

2.2. Funcionalização do 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrol **3 e do 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrolatogálio(III)(piridina) **4** via substituição nucleófila**

No âmbito do trabalho desenvolvido, pretendeu-se estudar a introdução de nucleófilos na posição *para* dos anéis pentafluorofenilo de **3** e **4**. De acordo com um estudo realizado por Osuka *et. al*^[41] o átomo de flúor nesta posição é o mais susceptível de sofrer reacção, sendo, portanto, o preferencialmente substituído. Este tipo de reacção já foi descrito para a 5,10,15-20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina e envolveu vários nucleófilos, nomeadamente, aminas primárias e secundárias, alcóxidos e tióis, tendo em vista a obtenção de derivados com diferentes funcionalidades, que lhes permitissem ser utilizados, por exemplo, em catálise, como sensores ou como moléculas fotossensibilizadoras em PDT.^[87] Na verdade, a grande vantagem da substituição nucleófila é o facto de permitir a introdução de novos grupos funcionais na molécula, resultando em alterações estruturais que podem conferir-lhe novas propriedades, como sejam a maior ou menor hidrofilicidade ou a introdução de carga, entre outras.

Sabendo que derivados porfirínicos com assimetria estrutural apresentam uma interessante actividade biológica como FS na inactivação de microorganismos e que os corróis são, já por si, moléculas com assimetria estrutural, pretendeu-se em todas as reacções obter o derivado tris-substituído, perspectivando-se a sua aplicação como FS.^[88]

Como ponto de partida para as reacções de substituição nucleófila estudadas neste trabalho, utilizaram-se as condições reaccionais descritas para a substituição do corrol **3**, por Osuka em 2010, já referidas na introdução deste trabalho - Esquema 5.

2.2.1. Estudos de funcionalização com nucleófilos aromáticos

O estudo desenvolvido neste trabalho iniciou-se com as reacções de substituição nucleófila envolvendo derivados aromáticos, mais especificamente, derivados da piridina. A escolha recaiu sobre aqueles que permitissem em fase posterior a inserção de cadeias alquílicas e, desta forma, a introdução de carga positiva nos novos derivados. Como já foi referido, este foi um dos objectivos deste trabalho experimental, já que a presença de carga positiva na estrutura molecular promove a eficiência do FS em bactérias Gram-negativas.

Deste modo, os nucleófilos escolhidos foram a 4-mercaptopiridina, 4-hidroxipiridina, 4-aminopiridina e a 4-aminometilpiridina - Figura 16.

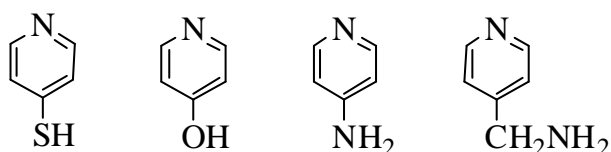
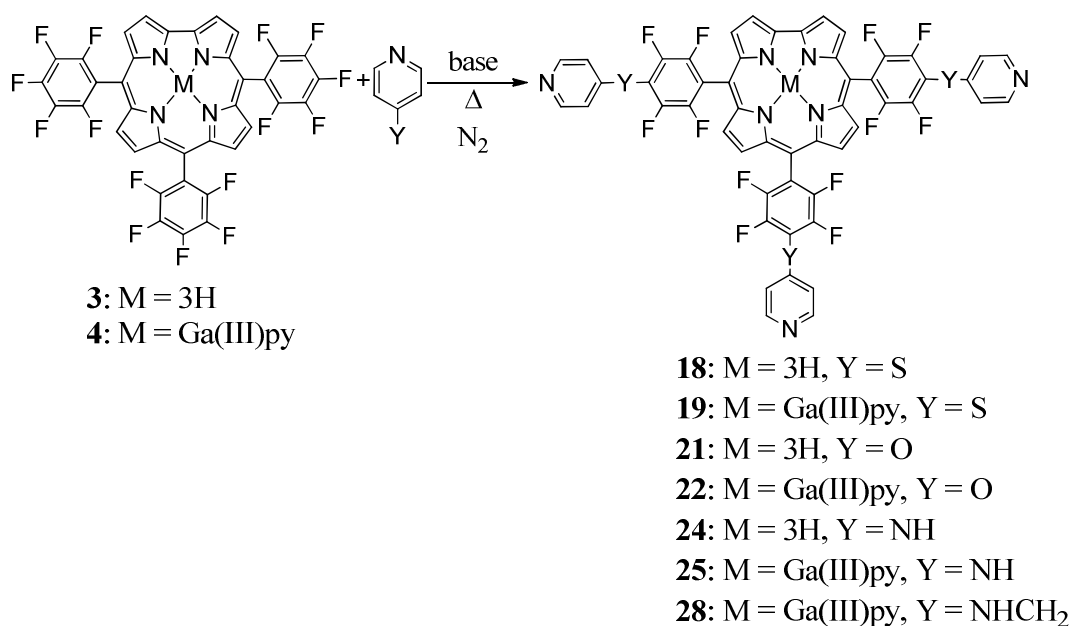


Figura 16 – Estruturas da 4-mercaptopiridina, 4-hidroxipiridina, 4-aminopiridina e 4-aminometilpiridina, respectivamente – derivados aromáticos utilizados como nucleófilos.

A escolha destes nucleófilos permitiria ainda avaliar a influência do heteroátomo nas ligações formadas (tioéter, éter ou amina) tanto a nível de reactividade como, posteriormente, a nível de características fotofísicas e biológicas dos derivados substituídos.

O Esquema 13 traduz o esquema reaccional geral para este tipo de substituições. No que diz respeito às condições reacionais utilizou-se um excesso de base e a temperatura variou entre a temperatura ambiente e os 120°C. Todas as reacções foram realizadas sob atmosfera de azoto e em tubo reaccional selado.



Esquema 13 – Esquema reaccional geral das substituições nucleófilas com derivados aromáticos.

2.2.1.1. Reacções com a 4-mercaptopiridina

O primeiro nucleófilo a ser testado foi a 4-mercaptopiridina. O estudo da reactividade com este nucleófilo teve início com a reacção entre o corrol **3** e aproximadamente 6 equivalentes de 4-mercaptopiridina, na presença de carbonato de potássio em excesso e utilizando DMSO como solvente. Ao fim de 3,5 horas o controlo

por TLC revelou a presença de três compostos de cor roxa, para além do composto de partida, e de uma base esverdeada (o que, habitualmente, é indicativo da ocorrência de degradação) na mistura reaccional - Figura 17.

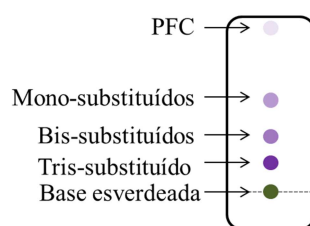


Figura 17 – Representação do TLC da mistura reaccional com a 4-mercaptopiridina e o corrol 3 ao fim de 3,5 horas.

Assim, a reacção foi terminada procedendo-se à neutralização do meio reaccional com uma solução aquosa de ácido cítrico, extracção da fase orgânica com diclorometano, seguida da sua lavagem com água destilada. Esta, depois de seca e o solvente evaporado, foi cromatografada e após avaliação por EM e RMN de ^1H e ^{19}F das três fracções recolhidas, concluiu-se que os compostos correspondiam aos derivados mono-substituídos (m/z 888 $[\text{M}+\text{H}]^+$), bis-substituídos (m/z 979 $[\text{M}+\text{H}]^+$) - Figura 18 - e tris-substituído **18** (m/z 1070 $[\text{M}+\text{H}]^+$) - Esquema 13.

Considerando os resultados obtidos e, uma vez que, como referido anteriormente, o composto pretendido era o derivado tris-substituído **18**, decidiu-se experimentar diversas condições reaccionais. Alterou-se a temperatura, o tempo, o solvente e o número de equivalentes, tendo sido consideradas as melhores condições para a obtenção de **18** a utilização de 9 equivalentes de 4-mercaptopiridina em DMSO, na presença de K_2CO_3 , à temperatura ambiente e sob atmosfera de azoto durante 3 horas.

Assim, nestas condições, o TLC da mistura reaccional após três horas revelou a prevalência de um composto relativamente aos outros que, por analogia, se identificou como sendo o derivado tris-substituído. Neste caso não se detectaram tantos produtos de degradação. Daqui se conclui que a 4-mercaptopiridina deve estar num excesso superior a seis equivalentes, de modo a que a reacção seja mais rápida, evitando, portanto, a degradação dos compostos no meio reaccional. O rendimento da síntese do 5,10,15-tris[4-(piridin-4-ilsulfanil)-2,3,5,6-tetrafluorofenil]corrol **18** foi cerca de 12%.

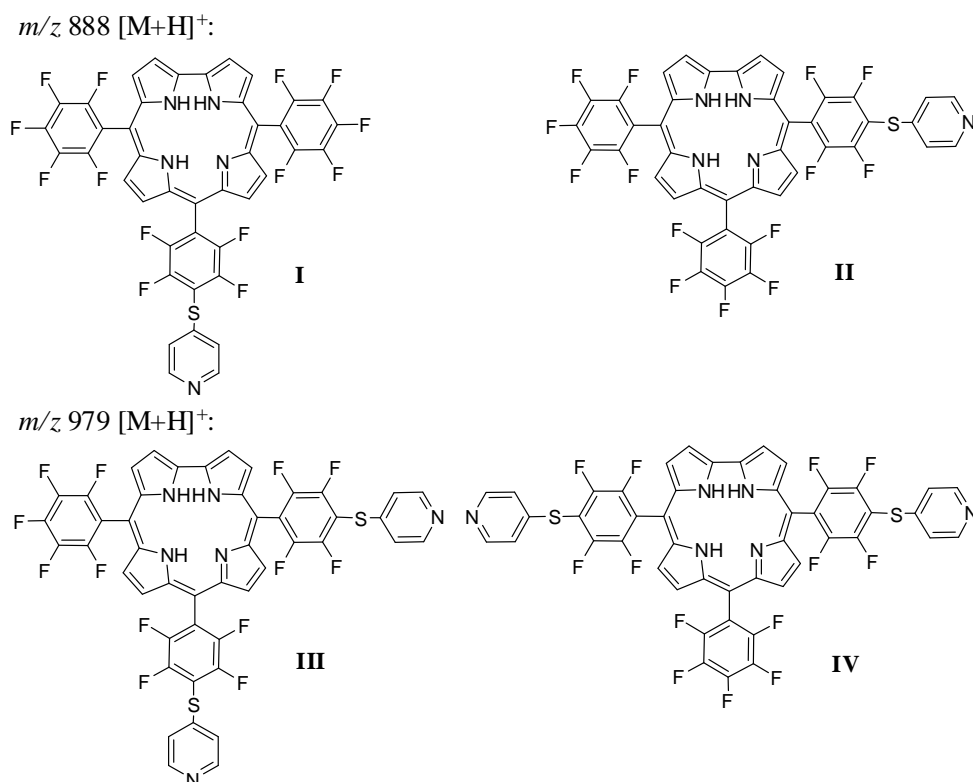


Figura 18 – Estruturas dos derivados mono- (I e II) e bis-substituídos (III e IV) obtidos pela reacção do corrol 3 com a 4-mercaptodipiridina.

Decidiu-se, então, testar as mesmas condições com o complexo de gálio(III) **4**. Uma vez que a 4-mercaptopiridina é o reagente em excesso, usou-se, aproximadamente, o mesmo número de equivalentes. Ao fim de 2,5 horas, o TLC de controlo revelou já não existir corrol de partida na mistura reaccional e revelou também o aparecimento de duas manchas de cor rosa-esverdeadas e uma base verde (Figura 19), pelo que se optou por terminar a reacção.

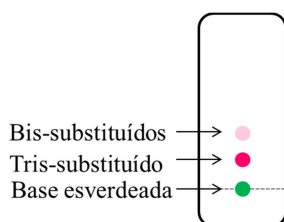


Figura 19 – Representação do TLC da mistura reaccional com a 4-mercaptopiridina e o corrol 4 ao fim de 2,5 horas.

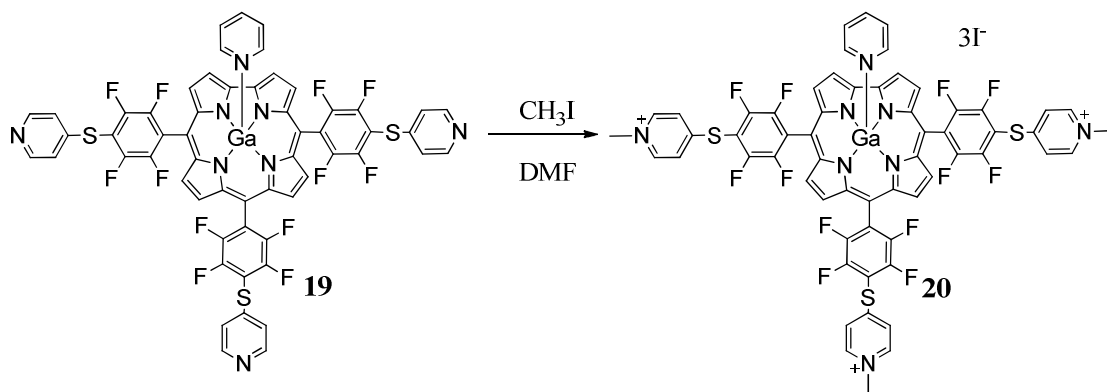
Após o *work-up* da mistura reaccional, os diversos constituintes foram separados por cromatografia em coluna. A análise por EM das fracções recolhidas revelou a correspondência da fracção de cor rosa menos polar a uma possível mistura dos dois derivados bis-substituídos (m/z 1044 $[M-py+H]^+$) e a mais polar ao derivado tris-

substituído (m/z 1136 $[M-py+H]^+$). O rendimento obtido para o derivado **19** nestas condições foi de 27%.

É de realçar que, relativamente à reacção com o corrol **3**, a reacção com o complexo de gálio(III) não só ocorre mais rapidamente como também apresenta um rendimento superior.

2.2.1.1.1. Metilação do 5,10,15-[4-(piridin-4-ilsulfanil)-2,3,5,6-tetrafluorofenil]corrolatogálio(III)(piridina) **19**

É de referir que não se tentou obter o derivado tricatiónico do composto **18**, na medida em que os átomos de azoto internos são facilmente alquilados, como foi provado num estudo realizado por Barata *et. al.*^[89] Desta forma, a reacção foi conduzida apenas na presença do derivado complexado **19** - Esquema 14.



Esquema 14 - Esquema reaccional da síntese de tri-iodeto de 5,10,15-tris[4-(1-metilpiridínio-4-ilsulfanil)-2,3,5,6-tetrafluorofenil]corrolatogálio(III)(piridina).

A reacção ocorreu em DMF a 40°C e após 12 horas o composto **20** foi precipitado numa mistura de metanol e éter etílico, tendo sido obtido quantitativamente.

2.2.1.2. Reacções com a 4-hidroxipiridina

O nucleófilo seguinte a ser testado foi a 4-hidroxipiridina. Com vista à optimização das condições reaccionais foram testados diferentes solventes (DMF e DMSO), bases (K_2CO_3 e Cs_2CO_3), temperaturas (20°C – 120°C) e equivalentes de nucleófilo (6 a 17 equivalentes).

Os estudos de substituição do corrol **3** foram iniciados usando as condições descritas para a reacção com a 4-mercaptopiridina: 6 equivalentes de nucleófilo, K_2CO_3 , atmosfera de azoto e temperatura ambiente. Os TLCs de controlo realizados nas diversas condições testadas em DMSO mostraram que, para além de se recuperar corrol

de partida **3**, se formavam os derivados mono-substituídos, confirmados por EM m/z 872 $[M+H]^+$, e uma base verde forte, indicativa de produtos de degradação - Figura 20.

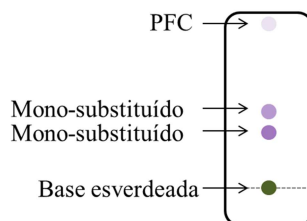


Figura 20 – Representação geral dos TLCs das misturas reacionais obtidas nas diversas condições testadas utilizando DMSO como solvente.

Assim, pensou-se que ao fim da primeira substituição o derivado mono-substituído formado começava a degradar, sendo impossível prosseguir a reacção de substituição em DMSO.

No entanto, quando se utilizou DMF como solvente a 40°C e com diferentes proporções de nucleófilo relativamente a **3** (4,5 a 9 equivalentes), foi possível isolar, embora em pequenas quantidades, o derivado tris-substituído **21** (Esquema 13) e os restantes derivados resultantes da substituição nucleófila (Figura 22). Na Figura 21 pode observar-se uma representação geral dos TLC's das misturas reacionais testadas nestas condições.

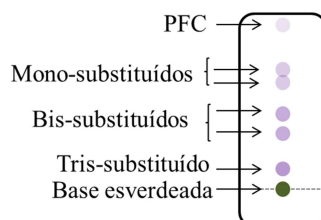


Figura 21 – Representação geral dos TLC's das misturas reacionais testadas nas condições acima descritas.

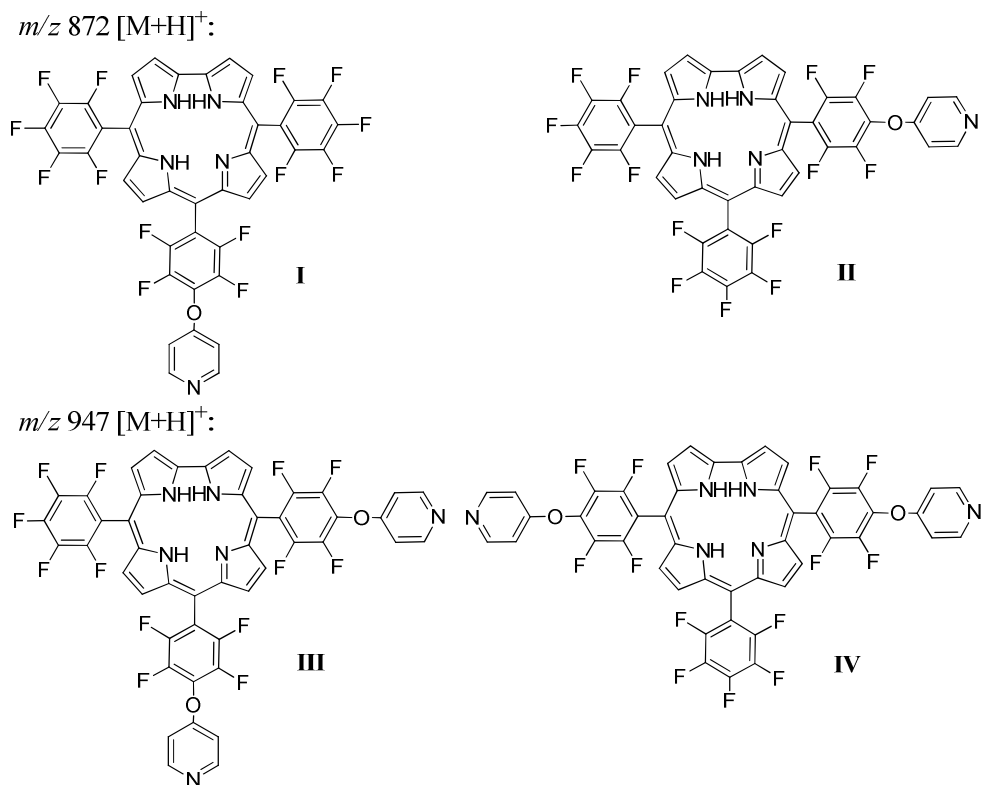


Figura 22 – Estruturas dos dois isómeros de cada derivado mono-substituído (**I** e **II**) e bis-substituído (**III** e **IV**) com a 4-hidroxipiridina.

Os espectros de massa das diferentes fracções revelaram termos isolado, por ordem de eluição, cada um dos dois isómeros mono-substituídos (m/z 872 $[M+H]^+$), cada um dos dois isómeros bis-substituídos (m/z 947 $[M+H]^+$) - Figura 22 - e o derivado tris-substituído **21** (m/z 1022 $[M+H]^+$) - Esquema 13.

O composto tris-substituído **21** foi, então, sintetizado pela primeira vez. Porém, foi obtido em muito pouca quantidade, visto que se obtiveram também os restantes derivados substituídos, o que impede uma possível aplicação.

Note-se que as diversas condições experimentais foram testadas mais do que uma vez, não tendo sido obtidos sequer, em muitos dos casos, resultados reprodutíveis. O problema da degradação, nomeadamente a presença de uma base verde, foi uma constante.

Uma vez que os resultados com o 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrol **3** não foram satisfatórios, experimentou-se a reacção com o complexo de gálio(III) **4**. Assim, com base na experiência adquirida com a forma livre do corrol, a reacção com a 4-hidroxipiridina foi também testada em várias condições, tendo sido realizada em DMF e em DMSO, à temperatura de 40°C e 80°C, na presença de K_2CO_3 e variando a proporção entre o corrol **4** e o nucleófilo.

Começou-se por utilizar o corrol **4** e 10 equivalentes de 4-hidroxipiridina em DMF a 40°C. Ao fim de 2 horas o TLC revelou quantidades vestigiais do reagente de partida, razão pela qual a reacção foi terminada. Neste caso, e após o tratamento e separação cromatográfica da mistura reaccional, foram recolhidas três fracções que foram analisadas por EM, tendo sido identificadas como sendo constituídas pelo corrol **4** e cada um dos isómeros mono-substituídos (m/z 938 $[M-Py+H]^+$), por ordem crescente de polaridade.

Um aumento da temperatura para 80°C, relativamente às condições anteriores, levou à perda total por degradação, ao fim de 30 minutos, dos componentes da mistura reaccional.

Numa outra tentativa alterou-se o solvente para DMSO e voltou a utilizar-se uma temperatura de 40°C. Desta vez, numa primeira fase adicionou-se apenas a base, o solvente e a 4-hidroxipiridina, de forma a gerar o alcóxido, e apenas passados vinte minutos se adicionou o corrol **4**. A reacção foi terminada ao fim de 1,5 horas devido a, por TLC, se observar a existência de duas novas manchas de cor rosa, para além da mancha relativa ao corrol **4** e de uma mancha ténue correspondente à base esverdeada - Figura 23.

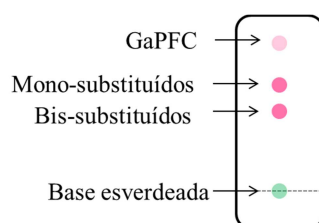


Figura 23 – Representação do TLC da mistura reaccional acima descrita ao fim de 1,5 horas.

Após o procedimento de tratamento da mistura reaccional já descrito, esta foi cromatografada e recolheram-se 3 fracções, sendo que a primeira correspondia ao corrol de partida. As outras duas, analisadas por EM, correspondiam, respectivamente, aos derivados mono-substituídos (m/z 938 $[M-Py+H]^+$) e bis-substituídos (m/z 1012 $[M-Py]^+$).

Decidiu-se, então, realizar a reacção em DMSO e a 40°C mas utilizando nove equivalentes de nucleófilo adicionados faseadamente. A reacção foi terminada ao fim de 1,5 horas, visto o TLC revelar a existência de cinco manchas novas de cor rosa, para além do corrol **4** de partida - Figura 24. Apesar de ainda existir alguma quantidade de reagente de partida, optou-se por tentar isolar o composto que se pensou ser o tris-

substituído, embora num rendimento baixo, evitando perder os compostos sintetizados por degradação ao tentar forçar a tris-substituição, como já havia acontecido.

Após o *work-up* da mistura reaccional os compostos foram separados por cromatografia em coluna, tendo-se separado apenas três fracções. Estas foram analisadas por RMN de ^1H e de ^{19}F , o que permitiu perceber que a primeira fracção era constituída pelos dois isómeros mono-substituídos, a segunda fracção era constituída pelos dois isómeros bis-substituídos e a terceira fracção correspondia ao derivado tris-substituído.

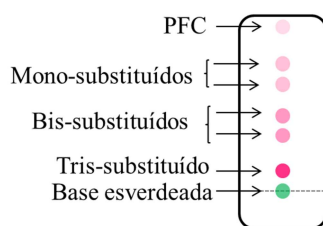


Figura 24 – Representação do TLC da mistura reaccional acima referida ao fim de 1,5 horas.

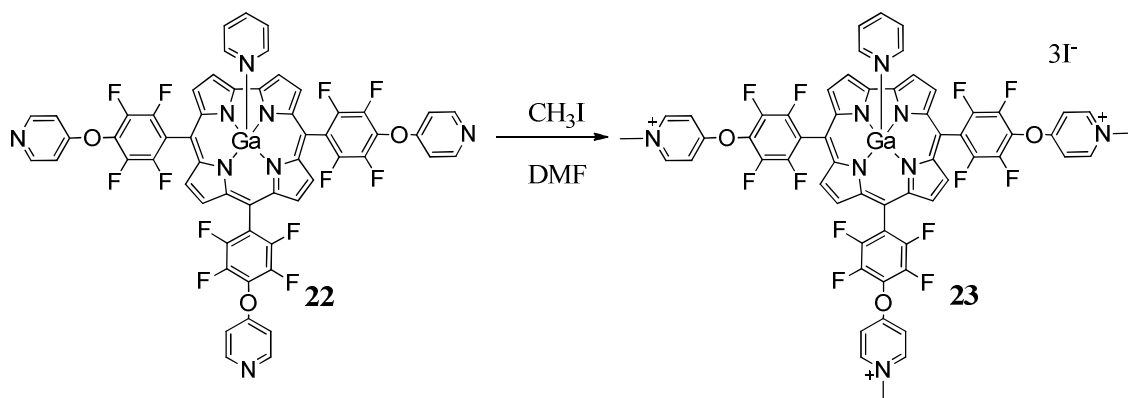
Nestas condições foi possível obter o composto **22** com um rendimento de 10%.

Os resultados desta reacção foram uma grande vitória, na medida em que, finalmente se conseguiu sintetizar o derivado tris-substituído **22**. A reacção foi repetida várias vezes, de modo a obter uma quantidade razoável de composto para posterior metilação.

2.2.1.2.1. Metilação do 5,10,15-tris[4-(piridin-4-iloxi)-2,3,5,6-tetrafluorofenil]corrolatogálio(III)(piridina) **22**

O derivado **22** foi submetido a uma reacção de metilação, por forma a obter o derivado tricatiónico, **23** - Esquema 15. A metilação foi realizada de acordo com o procedimento descrito para a metilação do derivado **19**.

Tal como no caso anterior, o novo derivado catiónico **23** precipitou numa mistura de metanol e éter etílico, sendo obtido quantitativamente.



Esquema 15 – Esquema reaccional da síntese de tri-iodeto 5,10,15-tris[(1-metilpiridínio-4-iloxi)-2,3,5,6-tetrafluorofenil]corrolatogálio(III)(piridina) **23**.

2.2.1.3. Reacções com a 4-aminopiridina

O terceiro nucleófilo testado foi a 4-aminopiridina. O estudo desta reacção iniciou-se com a utilização de nove equivalentes de nucleófilo, DMF e K_2CO_3 , num tubo reaccional selado que foi colocado a $70^\circ C$.

Ao fim de uma hora de reacção o TLC revelou a existência de duas manchas roxas novas, para além da mancha relativa ao corrol **3**. Deste modo, a reacção foi mantida nas mesmas condições durante mais 2,5 horas. O TLC realizado findo este período não revelou evolução, para além disso, mostrou o aparecimento de produtos de degradação, razão pela qual se decidiu terminar a reacção. Após o tratamento habitual da mistura reaccional, os seus constituintes foram separados por cromatografia. Recolheu-se o corrol precursor e as duas manchas roxas novas, que foram analisadas por EM. O espectro de massa da primeira mancha eluída (por ordem crescente de polaridade) revelou tratar-se de um composto com uma razão m/z 1647, sugerindo-se que se tenha formado a estrutura dimérica **26** (Figura 25), onde ocorre a substituição de duas unidades de corrol por uma molécula de 4-aminopiridina. O espectro de massa do terceiro composto recolhido não foi conclusivo, podendo apenas verificar-se não estarmos na presença do derivado tris-substituído.

Atendendo à quantidade diminuta de cada um destes compostos, não foi possível realizar uma análise por RMN.

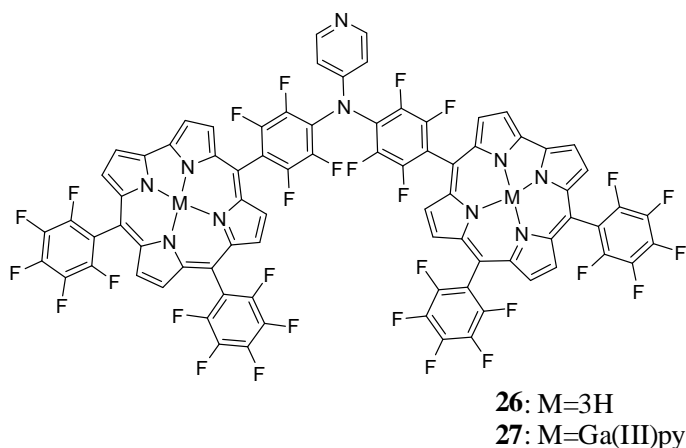


Figura 25 – Estruturas proposta para os derivados **26** e **27** obtidos nas reacções do corrol **3** e **4** com a 4-aminopiridina, respectivamente.

Como não se conseguiu sintetizar o composto **24** pretendido nestas condições, decidiu-se repetir a reacção mas alterando o solvente para DMSO. No entanto, apesar de se ter prolongado o tempo reaccional para além das 7 horas, foi recuperado maioritariamente o corrol de partida **3** e duas manchas roxas que, por análise dos respectivos espectros de massa se concluiu corresponderem ao derivado **26** e ao derivado mono-substituído (m/z 871 $[M+H]^+$) - Figura 26.

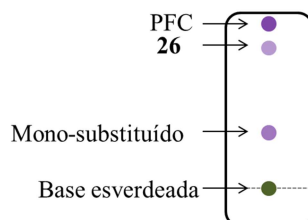


Figura 26 - Representação do TLC da mistura reaccional acima referida ao fim de 7 horas.

Atendendo a que os resultados das tentativas de substituição nucleófila no corrol **3** com a 4-aminopiridina não foram de encontro ao que se esperava e como os derivados dos corróis complexados já haviam demonstrado ser mais estáveis, testaram-se as mesmas condições para a reacção com o corrol **4**.

Embora tenham sido realizadas várias tentativas usando diferentes proporções de nucleófilo, temperatura e solvente, não foi possível obter o composto **25** pretendido. Obteve-se sempre nestas reacções o derivado **27**, análogo ao dímero **26** obtido anteriormente.

Com base nos resultados obtidos, sugere-se que a 4-aminopiridina polimerize nestas condições e não reaja eficientemente com o corrol.

2.2.1.4. Reacções com a 4-aminometilpiridina

O último nucleófilo aromático a ser testado foi a 4-aminometilpiridina. Atendendo a que ao longo do estudo das restantes reacções se obtiveram melhores resultados com o corrol complexado, estudou-se apenas a reacção de substituição nucleófila da 4-aminometilpiridina com o corrol **4** - Esquema 13.

Inicialmente testou-se a reacção com dez equivalentes de nucleófilo em DMSO, na presença de base (K_2CO_3) e a 40°C. Após 1,5 horas e atendendo a que o TLC revelou a não ocorrência de reacção, aumentou-se a temperatura para 70°C. A reacção ocorreu durante 54 horas e com a adição de mais 10 equivalentes de nucleófilo ao fim das primeiras 24 horas. A monitorização por TLC revelou que se formaram, para além da base esverdeada indicativa de degradação, três compostos de cor rosa (Figura 27) e a reacção foi terminada por não apresentar evolução.

Após o tratamento habitual da mistura reaccional, os seus constituintes foram separados por cromatografia em coluna, tendo-se recolhido três fracções, para além do corrol precursor **4**. A análise dos espectros de massa das fracções recolhidas revelou que o primeiro e segundo compostos (por ordem crescente de polaridade) correspondiam a cada um dos isómeros mono-substituídos (m/z 950 $[M-py]^+$) e o terceiro composto correspondia à mistura (confirmado pelo espectros de RMN de 1H e ^{19}F) dos derivados bis-substituídos (m/z 1038 $[M-py]^+$).

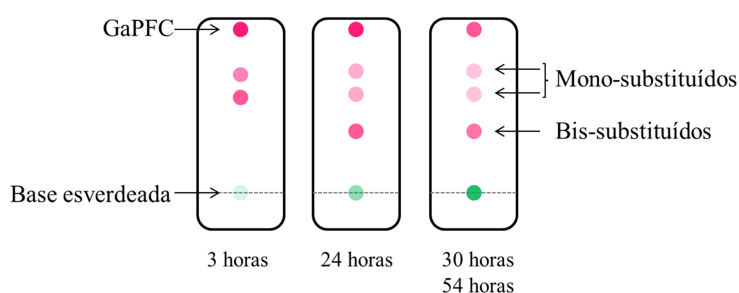


Figura 27 – Representação da monitorização por TLC da reacção acima descrita.

Numa tentativa de diminuir o tempo de reacção e de sintetizar o derivado tris-substituído, a reacção foi realizada nas mesmas condições mas a 120°C. Ao fim de 7 horas a análise do TLC de controlo revelou a presença do corrol **4** no meio reaccional, bem como de três fracções de cor rosa e de uma fracção maioritária esverdeada. A terceira fracção de cor rosa apresentava um r_f inferior à da fracção correspondente aos derivados bis-substituídos, por comparação.

Após *work-up* da mistura reaccional, os seus constituintes foram separados por cromatografia preparativa. Apenas se conseguiu separar o corrol **4** e a quarta mancha rosa, atendendo à quantidade diminuta das restantes. Esta fracção foi analisada por EM, no entanto, análise não foi conclusiva. A quantidade recolhida não permitiu que se realizasse uma análise por RMN.

Até ao momento não foi possível preparar o derivado **28** pretendido.

2.2.1.5. Caracterização estrutural

Os espectros de absorção de visível dos derivados **18**, **19** e **20** apresentam-se na Figura 28 e as suas características de absorção estão resumidas na Tabela 3.

Tal como esperado, o derivado **18** apresenta um comportamento semelhante ao do corrol **3**, apresentando a banda Soret a 445 nm e as bandas Q a 544 nm, 582 nm e 623 nm. A banda Soret e a última banda Q surgem a comprimentos de onda ligeiramente superiores relativamente às mesmas bandas de absorção no corrol precursor, ou seja, sofrem um efeito batocrómico. Verifica-se também que a banda Soret aparece ligeiramente mais larga do que noutros casos; este aspecto, bem como a fraca definição das bandas Q, podem ser indicativos da ocorrência de fenómenos de agregação neste solvente.

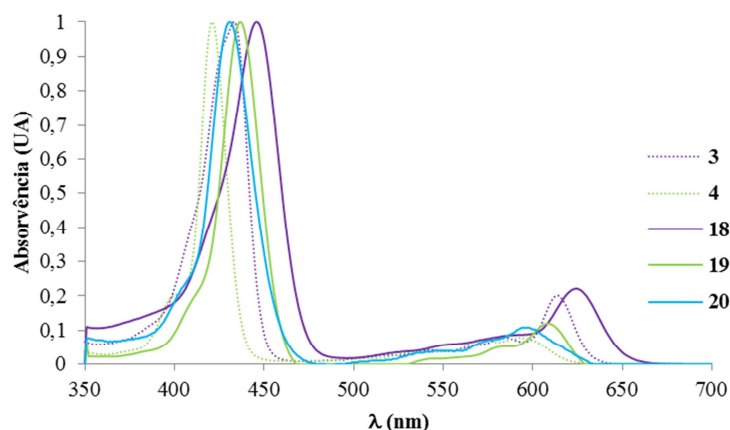


Figura 28 - Espectros de absorção visível normalizados dos compostos **18, **19** e **20** e dos precursores **3** e **4** em DMSO.**

Os derivados **19** e **20** apresentam um comportamento de absorção semelhante ao observado para o corrol **4**. As bandas de absorção surgem a comprimentos de onda ligeiramente superiores relativamente às da molécula precursora **4**, ou seja, tal como no

caso do corrol livre **3** a introdução de três unidades de 4-mercaptopiridina promove um efeito batocrômico nos espectros de absorção dos respectivos derivados.

Por outro lado, a introdução dos três grupos metilo que conferem carga positiva (+3) ao derivado **20** provoca um desvio da banda Soret e da última banda Q para comprimentos de onda ligeiramente inferiores, ou seja, efeito hipsocrômico, relativamente ao derivado não catiónico **19**.

Relativamente aos espectros de absorção dos derivados **22** e **23** - Figura 29 - observa-se que estes são bastante idênticos ao do corrol precursor **4**. Apresentam uma banda Soret a 424-426 nm e duas bandas Q sensivelmente ao mesmo comprimento de onda que as bandas de absorção observadas no espectro de absorção de **4**. Entre os derivados **22** e **23** há um ligeiro desvio das bandas Q do composto catiónico (**23**) para comprimentos de onda inferiores, um comportamento semelhante ao que acontece no caso de **20** em relação a **19**, o que se pensa que esteja relacionado com a introdução dos três grupos metilo na estrutura molecular, formando um derivado tri-catiónico.

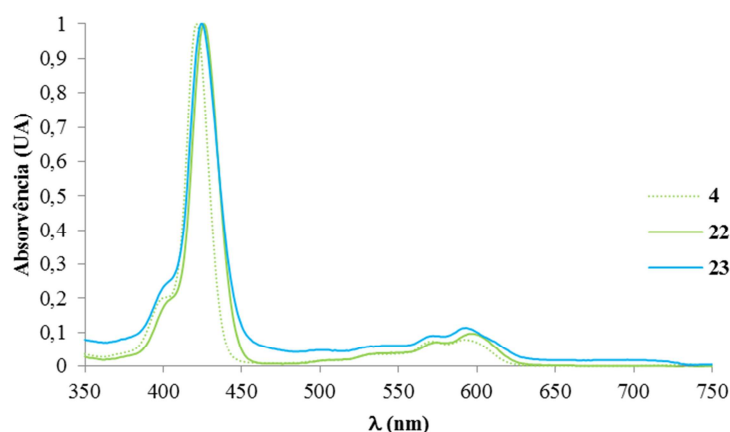


Figura 29 – Espectros de absorção de visível normalizados dos derivados **22** e **23** em DMSO.

Tabela 3 – Máximos de absorvência e coeficientes de extinção molar (ϵ , $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) dos derivados substituídos com nucleófilos aromáticos e dos corróis precursores 3 e 4 em DMSO.

Composto	Banda Soret (nm)	log ϵ	Bandas Q (nm)	log ϵ
3	434	5,20	543	4,00
			584	4,20
			614	4,54
4	423	5,42	574	4,39
			592	4,40
18	445	5,06	544	4,03
			582	4,14
			623	4,48
19	436	5,22	575	4,08
			607	4,39
20	430	5,10	577	4,67
			596	4,51
22	426	5,32	574	4,19
			597	4,33
23	424	5,22	572	4,04
			592	4,28

As estruturas dos novos derivados foram assinaladas inequivocamente com recurso às técnicas de RMN de 1H e de ^{19}F e de espectrometria de massa. Os derivados **18**, **19** e **20** apresentam espectros de RMN típicos dos corróis e dos corrolatos de gálio(III), respectivamente - Figura 30, Figura 31 e Figura 32.

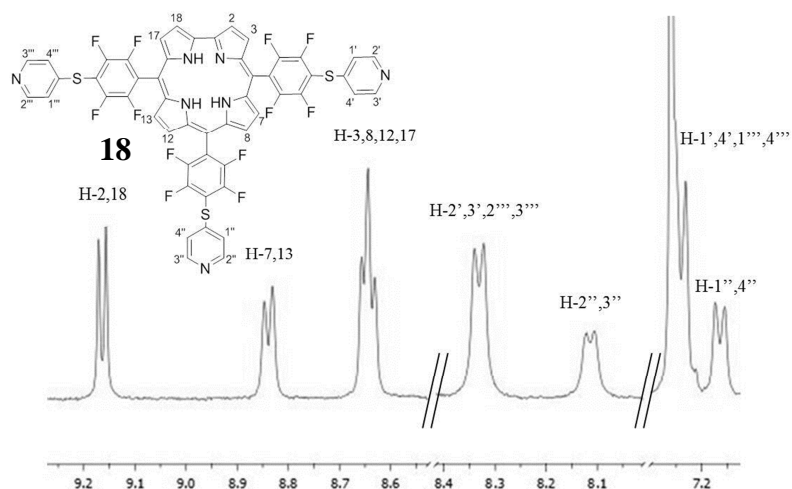


Figura 30 – Espectro parcial de RMN de 1H do composto 18 em $CDCl_3$.

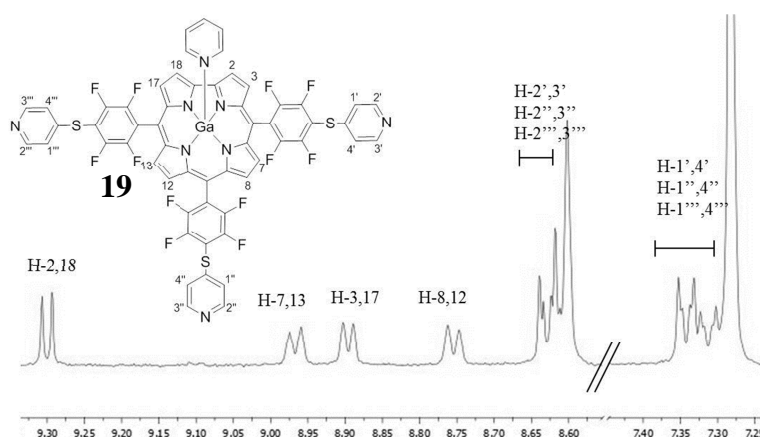


Figura 31 – Espectro parcial de RMN de ^1H do composto **19** em CDCl_3 com gotas de $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

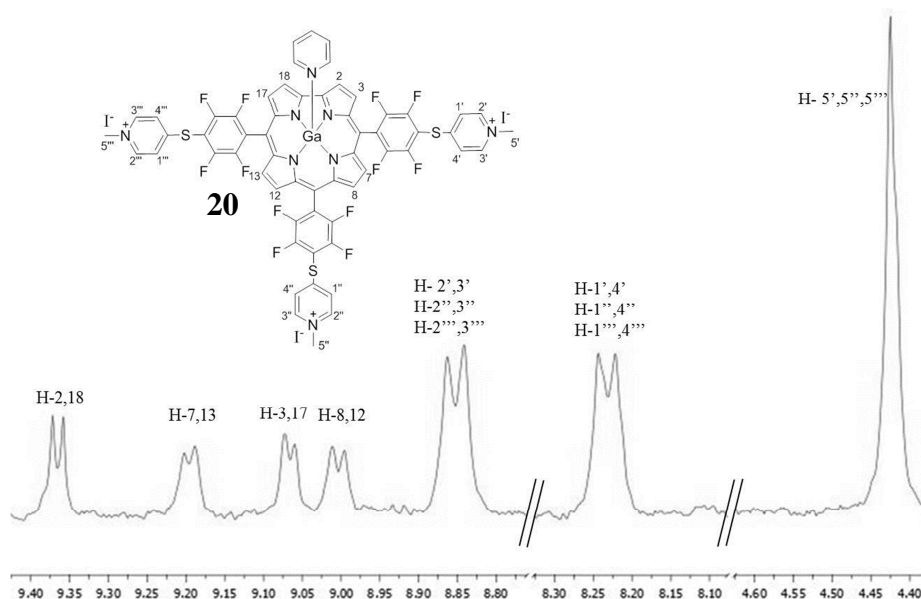


Figura 32 – Espectro parcial de RMN de ^1H do composto **20** em CD_3OD com gotas de $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

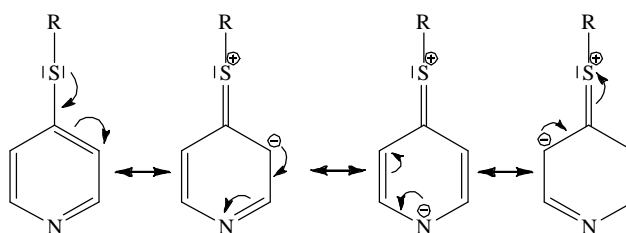
Nos espectros de RMN de ^1H dos três derivados os sinais gerados pela ressonância dos prótons β -pirrólicos surgem como sendo os mais desprotegidos, ou seja, a campos mais baixos. Por exemplo, no caso do derivado **20** aparecem na forma de quatro dupletos entre δ 9,40 e 8,95 ppm - Figura 32. Nos espectros de **18** e **19** os sinais dos mesmos prótons surgem sensivelmente na mesma zona de desvio químico e também como dupletos. Note-se que no caso de **18** os dupletos gerados pela ressonância de H-3,17 e H-8,12 surgem parcialmente sobrepostos - Figura 30.

Quanto aos sinais originados pela ressonância dos prótons da 4-mercaptopiridina, no caso do derivado livre **18**, verifica-se que os prótons 1',4',1''' e 4''' (posições 5 e 15), surgem a campos mais baixos relativamente aos prótons semelhantes da molécula de nucleófilo ligada ao grupo pentafluorofenilo na posição 10,

estando, portanto, mais desprotegidos. O mesmo acontece com os prótons 2',3',2''' e 3''' relativamente a 2'' e 3''. Assim, os quatro sinais surgem como dupletos perfeitamente assinaláveis entre δ 8,40 e 7,10 ppm, como se observa na Figura 30. Note-se que os sinais relativos à ressonância de H-1',4' e de H-1''',4''' aparecem parcialmente sobrepostos com o sinal da piridina (solvente).

Nos casos dos derivados **19** e **20**, a ressonância dos prótons em posição *orto* relativamente ao átomo de azoto gera apenas um sinal [que surge como um multipletto entre δ 8,64 – 8,60 ppm (**19**) e como dupletto a δ 8,85 ppm (**20**)] assim como os prótons em posição *meta*, cuja ressonância dá origem a um multipletto entre δ 7,37 - 7,33 ppm (**19**) e a um dupletto a δ 8,23 ppm (**20**) - Figura 31 e Figura 32. Mais uma vez, este facto está relacionado com a planaridade do macrociclo.

Note-se que em todos os casos os prótons em posição *orto* relativamente ao átomo de azoto se encontram mais desprotegidos do que os prótons em posição *meta*, o que poderá ser justificado com as estruturas de ressonância representadas no Esquema 16.



Esquema 16 – Estruturas de ressonância da 4-alquilsulfanilpiridina.

As posições *meta* relativamente ao átomo de azoto, apresentam um aumento da densidade electrónica e, desta forma, os sinais gerados pela ressonância destes prótons surgem a campos mais elevados, ou seja, a desvios químicos inferiores.

Por fim, o derivado **20** apresenta ainda um singuleto a δ 4,43 ppm relativo à ressonância dos prótons dos grupos metilo, responsáveis pelo seu carácter catiónico.

O espectro de RMN de ^1H do derivado **22** é análogo ao obtido para o derivado **19**. Destaca-se apenas o efeito de ressonância protector do oxigénio relativamente aos prótons do anel piridínico, que é claramente visível, nomeadamente, em relação ao enxofre (derivado **19**).

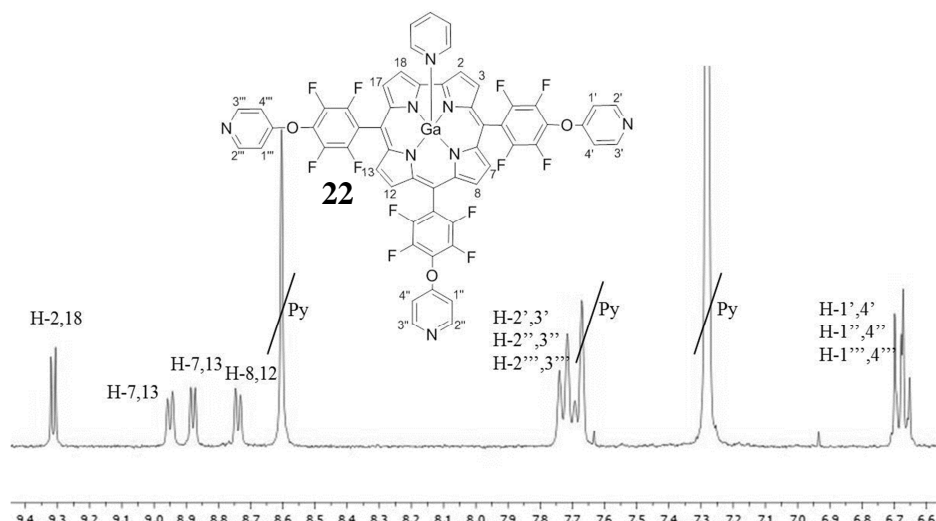


Figura 33 – Espectro de RMN de ^1H do derivado **22** em CDCl_3 com gotas de $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

Assim, os sinais que dizem respeito aos prótons do anel piridínico no derivado **22**, relativamente aos mesmos sinais no derivado **19**, encontram-se a campos mais altos. Tal como nos casos anteriores, os prótons *orto* relativamente ao átomo de azoto surgem mais desprotegidos do que os prótons em posição *meta*. Desta forma, observa-se um multiplete entre δ 7,79 - 7,74 ppm (parcialmente sobreposto ao sinal da piridina) correspondente aos prótons em posição *orto* e um multiplete entre δ 6,74 - 6,70 ppm correspondente aos prótons em posição *meta*.

Da análise dos espectros pode concluir-se que o efeito protector de ressonância do oxigénio é mais acentuado do que o efeito de ressonância do enxofre.

No caso do derivado catiónico **23** o espectro de RMN de ^1H é semelhante ao espectro de **22**, apresentando ainda dois singuletos a δ 3,37 e 3,22 ppm relativos à ressonância dos prótons dos grupos metilo.

O RMN de ^{19}F foi bastante importante na caracterização dos novos derivados sintetizados. A ausência do sinal gerado pela ressonância dos átomos de flúor em posição *para*, nos respectivos espectros, seria indicativa de uma total substituição das posições *para* dos grupos pentafluorofenilo.

Em nenhum dos espectros de RMN de ^{19}F dos novos derivados **18**, **19**, **20**, **22** e **23** se observa o sinal relativo à ressonância dos átomos de flúor em posição *para* - Figura 34 e Figura 35.

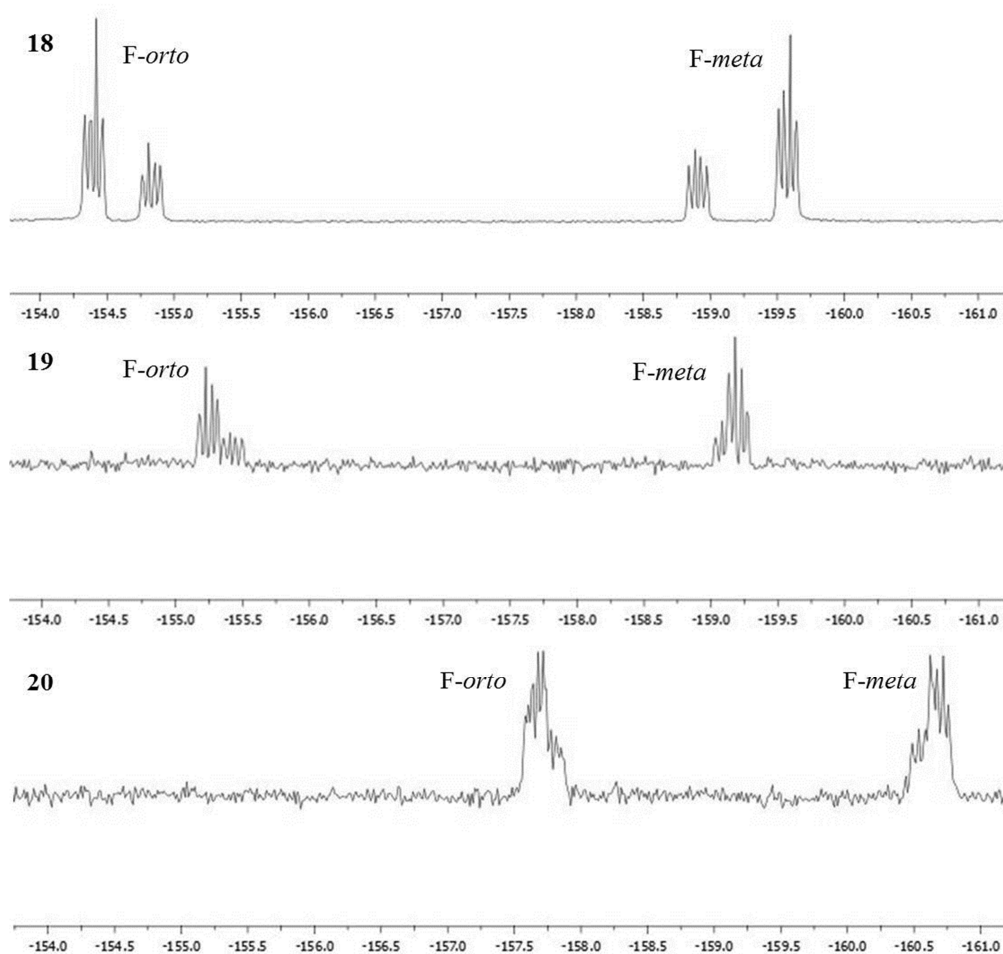


Figura 34 – Espectros de RMN de ^{19}F dos derivados **18** e **19** em CDCl_3 e **20** em CD_3OD .

Um aspecto bastante interessante e que despertou a nossa curiosidade foi o facto de, contrariamente ao que acontece nos corróis precursores **3** e **4** (Figura 15), os sinais de ressonância gerados pelos átomos de flúor dos derivados **18** e **19** se situarem entre δ - 155 e -161 ppm - Figura 34. Poderá dizer-se que o átomo de enxofre desprotege os átomos de flúor de um modo geral, contudo, este efeito desprotector é maioritariamente sentido nos átomos de flúor em posição *meta* relativamente ao macrociclo (ou em posição *orto* relativamente ao átomo de enxofre), atendendo a que existe um desvio do sinal de cerca de 25 ppm para campos mais baixos. Sugere-se que o efeito desprotector do enxofre por indução, prevaleça sobre o seu efeito protector por ressonância, daí que ocorra a desprotecção sobre os átomos de flúor.

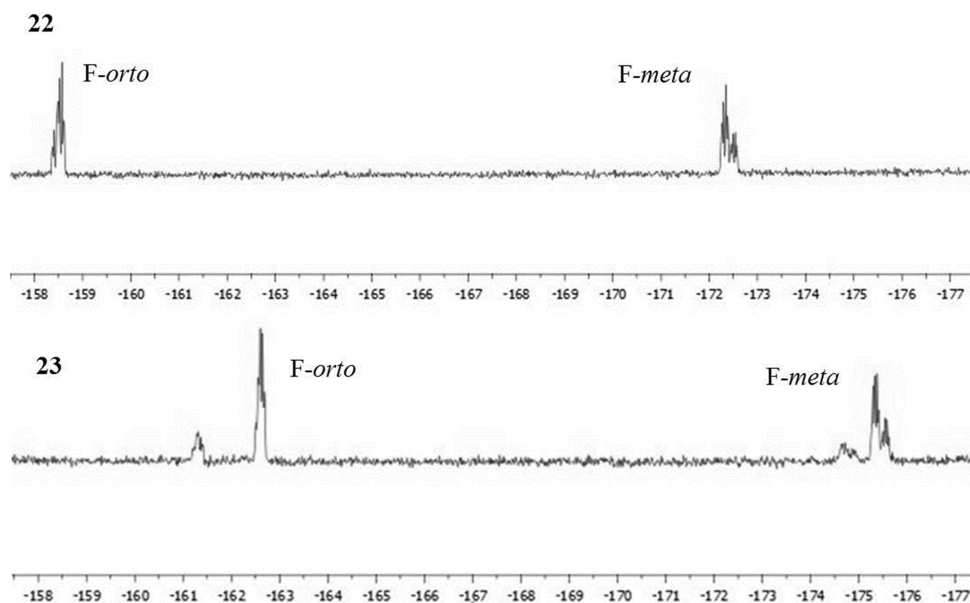


Figura 35 – Espectros de RMN de ^{19}F dos derivados **22** em CDCl_3 e **23** em CD_3OD .

Da mesma forma, a comparação dos desvios químicos a que surgem os sinais de ressonância originados pelos átomos de flúor em posição *orto* e *meta* do derivado **22** - Figura 35, com os mesmos sinais no espectro de RMN de ^{19}F do corrol **4** (Figura 15) revela que a introdução das três unidades de 4-hidroxipiridina promove uma diminuição da densidade electrónica nos átomos de flúor dos anéis pentafluorofenilo, provocando desvios dos sinais para campos mais baixos, nomeadamente para os átomos de flúor em posição *meta*.

Note-se que os desvios químicos a que surgem os sinais de ressonância nos espectros de ^{19}F dos derivados **20** e **23** não podem ser comparados com os dos respectivos precursores, já que foram realizados em solventes diferentes.

A análise por espectrometria de massa dos compostos sintetizados revela razões m/z de 1069 $[\text{M}]^+$, 1136 $[\text{M-Py+H}]^+$ e 589 $[\text{M-Py-H}]^{2+}$ para **18**, **19** e **20**, respectivamente, o que está de acordo com as estruturas propostas. No caso do derivado **22** o ião molecular detectado apresenta m/z 1088 $[\text{M-Py+H}]^+$.

Após a reacção ser dada por terminada, a mistura reaccional é neutralizada com uma solução aquosa de ácido cítrico, a fase orgânica extraída com diclorometano e lavada, pelo menos duas vezes, com água destilada. Em todos os casos se procedeu à separação cromatográfica para a obtenção do derivado tris-substituído pretendido.

Inicialmente estas reacções foram realizadas utilizando um grande excesso de nucleófilo relativamente ao corrol **3** (entre 150-330 equivalentes, consoante a cadeia do álcool em questão), num volume de 0,1 mL de DMSO. As reacções foram terminadas assim que se verificou a ausência do corrol de partida **3**, ou seja, ao fim de 24 horas para a reacção com o propano-1-ol, 27 horas para a reacção com o pentan-1-ol e 28 horas para a reacção com o octan-1-ol. Os TLC's de controlo das misturas reaccionais revelaram a presença de uma mancha roxa maioritária e algumas manchas esverdeadas e azuis, com R_f 's inferiores, no caso do propano-1-ol; e a presença de duas manchas de cor roxa e uma esverdeada, de R_f inferior, no caso do pentan-1-ol e do octan-1-ol - Figura 36. A base esverdeada é indicativa, como já foi referido, da presença de produtos de decomposição.

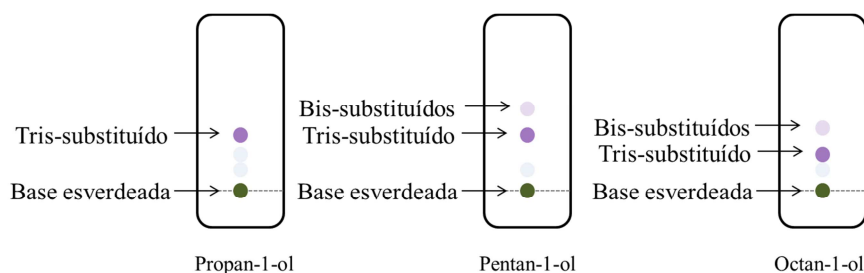


Figura 36 – Representação dos TLC's das reacções acima descritas ao fim de 24, 27 e 28 horas, respectivamente.

Após os procedimentos de neutralização e lavagem de cada mistura reaccional, os respectivos componentes foram separados por cromatografia. As fracções de cor roxa recolhidas foram analisadas por EM e, com base nos espectros obtidos pôde concluir-se que, no caso da reacção com o propan-1-ol, a fracção roxa era constituída pelo derivado tris-substituído (m/z 917 $[M+H]^+$) **29**; no caso da reacção com o pentan-1-ol estávamos na presença, por ordem crescente de polaridade, de uma possível mistura de derivados bis-substituídos (m/z 933 $[M+H]^+$) e do derivado tris-substituído **31** (m/z 1031 $[M+H]^+$); verificou-se o mesmo para a reacção com o octan-1-ol, cuja análise dos espectros de massa das fracções recolhidas revelou corresponderem a uma mistura dos derivados bis-substituídos (m/z 1016 M^+) e ao derivado tris-substituído (m/z 1127 M^+) **33**, por ordem de eluição.

Uma vez que se estava a utilizar um grande excesso de nucleófilo relativamente ao corrol **3**, considerou-se que seria importante tentar reduzir este volume para uma proporção inferior (30 equivalentes). Porém, a diminuição do número de equivalentes de nucleófilo nestas reacções resultou num aumento do tempo reaccional, num aumento dos produtos de degradação, e na obtenção de todos os possíveis derivados substituídos (Figura 37), o que deu origem a rendimentos muito baixos para a obtenção dos derivados **29** (3%), **31** (16%) e **33** (vestigial).

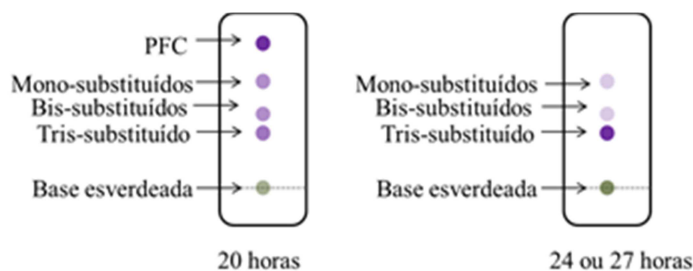


Figura 37 – Representação geral da monitorização por TLC das reacções acima descritas.

Na tentativa de melhorar o rendimento de síntese dos derivados tris-substituídos **29**, **31** e **33**, decidiu-se experimentar as reacções utilizando um excesso de nucleófilo menor do que no caso das primeiras condições testadas (entre 50-110 equivalentes, consoante a cadeia do álcool em questão) e, pensando que a concentração dos reagentes seria um factor de influência, aumentou-se o volume de DMSO de 0,1 mL para 0,3 mL.

Estas condições foram testadas e as reacções foram terminadas assim que se verificou, por analogia, que a mancha relativa ao respectivo derivado tris-substituído era maioritária. Assim, a reacção com o propan-1-ol decorreu durante 16 horas, com o pentan-1-ol decorreu durante 20 horas e com o octan-1-ol decorreu durante 23 horas, a 100°C. Para além dos derivados tris-substituídos pretendidos, em todos os casos se observou também a presença de outras manchas roxas com *rf*'s superiores (que se confirmou por EM corresponderem aos derivados mono-substituídos e bis-substituídos) e alguma degradação, embora numa proporção muito inferior relativamente à verificada nas condições reaccionais anteriormente testadas. As misturas reaccionais foram tratadas de acordo com o procedimento já descrito e após separação cromatográfica os derivados **29**, **31** e **33** foram obtidos com rendimentos de 38%, 34% e 66%, respectivamente.

Estas condições foram as que permitiram a obtenção dos derivados tris-substituídos pretendidos com os melhores rendimentos.

Note-se que estes compostos se revelaram bastante instáveis e, embora sejam tomadas todas as precauções em relação à protecção da luz e do ar, ao longo do processo de separação vão-se degradando, dando origem a compostos esverdeados.

Tendo sido estabelecidas as melhores condições reaccionais para a síntese dos derivados tris-substituídos do corrol **3**, estas foram aplicadas às reacções de substituição nucleófila dos mesmos álcoois com o complexo de gálio(III) **4**.

Assim, utilizou-se um excesso de nucleófilo (entre 60-130 equivalentes, consoante a reacção fosse com o propan-1-ol, pentan-1-ol ou octan-1-ol), na presença de K_2CO_3 também em excesso, em 0,3 mL de DMSO e a uma temperatura de 100°C. As reacções foram monitorizadas por TLC e terminadas quando se verificou a ausência de corrol **4**.

No caso dos álcoois com cadeias de 3 e 5 carbonos os tempos de reacção foram superiores relativamente às reacções com o corrol **3**, demorando cerca de 22 horas. Por outro lado, na reacção com o octan-1-ol o tempo reaccional mantém-se, sendo que a reacção demora, aproximadamente, 23 horas. Ao fim deste período os derivados tris-substituídos (confirmados por EM, m/z 982 $[M-py]^+$, 1066 $[M-py]^+$ e 1192 $[M-py]^+$, respectivamente) são os compostos maioritários, observando-se, porém, alguma degradação (que tende a aumentar durante os processos de purificação). Desta forma, os compostos **30**, **32** e **34** foram obtidos com rendimentos de 13%, 39% e 79%, respectivamente.

2.2.2.1.1. Caracterização estrutural

Todos estes compostos sintetizados foram sujeitos a caracterização espectroscópica de UV-Vis, RMN de 1H e de ^{19}F e Espectrometria de Massa.

Os espectros de absorção de visível dos derivados de **3** - **29**, **31** e **33** – e dos derivados de **4** – **32**, **34** e **36** -, bem como os dos precursores, apresentam-se na Figura 38 e na Figura 39, respectivamente.

Como é observável através dos seus espectros, os derivados obtidos a partir do corrol **3** apresentam um comportamento muito semelhante ao do seu precursor, registando-se apenas um ténue desvio dos máximos de absorção para comprimentos de onda ligeiramente superiores.

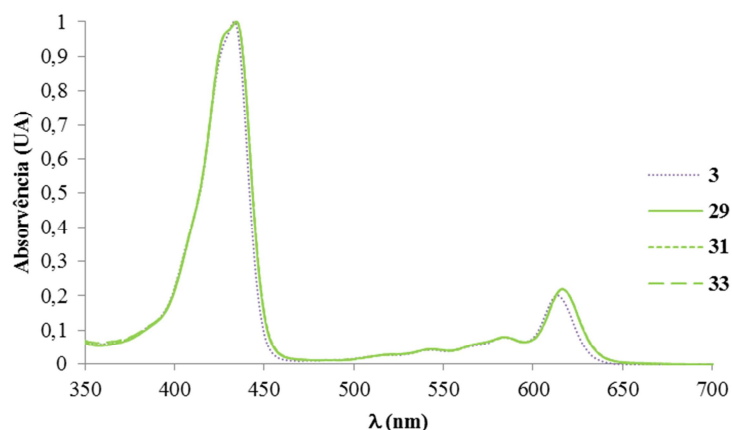


Figura 38 - Espectros de absorção visível normalizados dos derivados 29, 31 e 33 e do corrol 3 em DMSO.

Na Tabela 4 encontram-se resumidas as características de absorção dos derivados **29**, **31** e **33**. É de salientar que se observaram valores de coeficientes de extinção nas bandas Q ligeiramente mais baixos relativamente ao corrol **3**, em DMSO.

Tabela 4 – Máximos de absorvência e coeficientes de extinção molar (ϵ , $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) dos derivados 29, 31 e 33 e dos corrol precursor 3 em DMSO.

Composto	Banda Soret (nm)	$\log \epsilon$	Bandas Q (nm)	$\log \epsilon$
3	434	5,20	543	4,00
			584	4,20
			614	4,54
29	435	5,06	545	3,72
			585	3,97
			618	4,38
31	435	5,02	545	3,70
			585	3,90
			618	4,36
33	435	5,03	545	3,64
			585	3,90
			618	4,40

Pela análise dos espectros de absorção dos derivados obtidos a partir do corrol **4** (Figura 39) verifica-se, tal como nos casos anteriores, um pequeno efeito batocrómico relativamente aos máximos de absorção, mantendo-se o comportamento de absorção. Cada derivado apresenta uma banda Soret e duas bandas Q e as características de absorção de cada um encontram-se resumidas na Tabela 5.

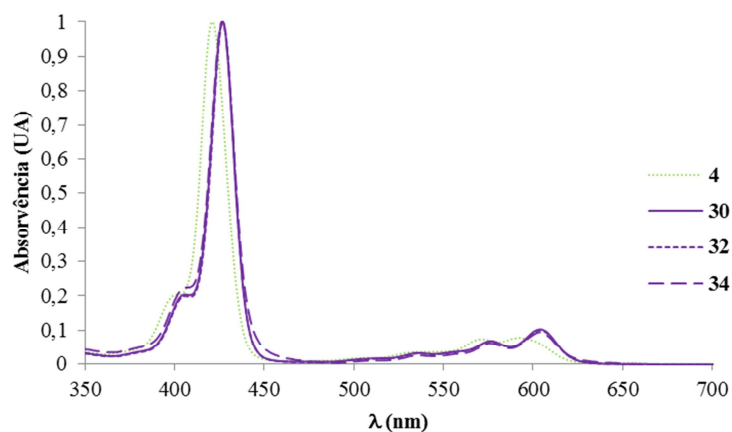


Figura 39 - Espectros de absorção de visível normalizados dos derivados 30, 32 e 34 e do corrol 4 em DMSO.

Tabela 5 – Máximos de absorvência e coeficientes de extinção molar (ϵ , $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) dos derivados 30, 32 e 34 e dos corrol precursor 4 em DMSO.

Composto	Banda Soret (nm)	$\log \epsilon$	Bandas Q (nm)	$\log \epsilon$
4	423	5,42	574	4,39
			593	4,40
32	427	5,33	577	4,18
			605	4,35
34	428	5,46	578	4,31
			605	4,47
36	428	5,17	578	4,04
			605	4,20

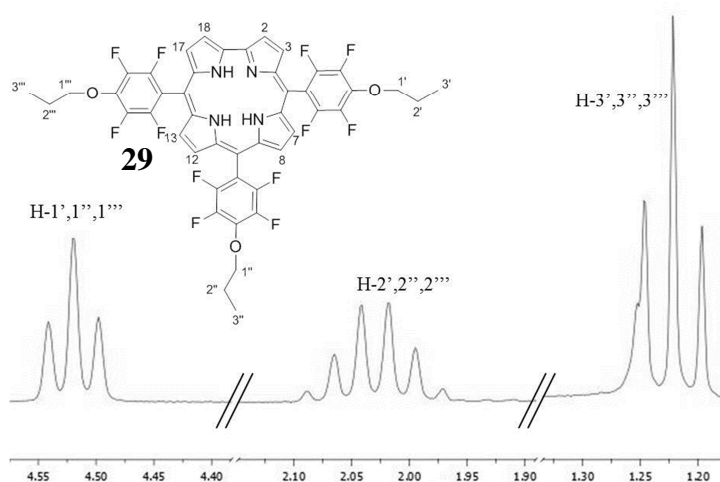
Pode concluir-se que a introdução do grupo substituinte quase não interfere com as características de absorção de nenhum dos derivados, na medida em que o comportamento de absorção destes é idêntico ao comportamento dos corrols precursores **3** e **4**.

Uma vez que nos pontos anteriores já foram apresentadas e discutidas as zonas aromáticas dos espectros de RMN de ^1H do macrociclo corrólico e, atendendo a que os sinais gerados pela ressonância dos prótons β -pirrólicos são exactamente iguais para cada série de derivados, apresentar-se-á apenas uma tabela com estes dados - Tabela 6.

Tabela 6 – Sinais gerados pela ressonância dos prótons β -pirrólicos nos derivados de 3 e de 4.

Composto	δ (ppm)	Multiplicidade	H
29, 31, 33	9,06	duplete	2, 18
	8,78	duplete	7, 13
	8,60 - 8,56	multiplete	3, 8, 12, 17
30, 32, 34	9,20	duplete	2, 18
	8,87	duplete	7, 13
	8,81	duplete	3, 17
	8,65	duplete	8, 12

De seguida apresentam-se apenas as zonas alifáticas dos espectros de RMN de ^1H dos derivados **29**, **31** e **33** (Figura 40, Figura 41 e Figura 42). Os sinais de ressonância originados pelos prótons das cadeias alifáticas dos álcoois encontram-se assinalados nos espectros correspondentes. Em todos os casos, os prótons pertencentes ao carbono imediatamente ligado ao átomo de oxigénio surgem na forma de triplete a campos mais baixos ($\delta \approx 4,55$ ppm), estando, portanto, mais desprotegidos, o que terá a ver com o efeito sacador de electrões por indução do oxigénio.

Figura 40 - Espectro de RMN de ^1H parcial do derivado **29** em CDCl_3 .

O sinal do grupo metilo terminal é também comum aos três derivados. Independentemente do número de átomos de carbono da cadeia do nucleófilo, este sinal é o que surge a campos mais elevados (entre δ 1,2 e 0,9 ppm, conforme o derivado), aparecendo na forma de triplete.

O sinal originado pela ressonância dos prótons H-2',2'' e 2''' surge na forma de sexteto a δ 2,03 ppm para o derivado **29** e no caso dos derivados **31** e **33** surge na forma de quinteto a δ 2,01 ppm e a δ 2,00 ppm, respectivamente.

No caso dos derivados **31** e **33** os sinais correspondentes à ressonância dos grupos CH₂ em terceira e quarta posições (H-3',3'',3''',4',4'' e 4''') surgem na forma de multipeto entre δ 1,70 e 1,55 ppm.

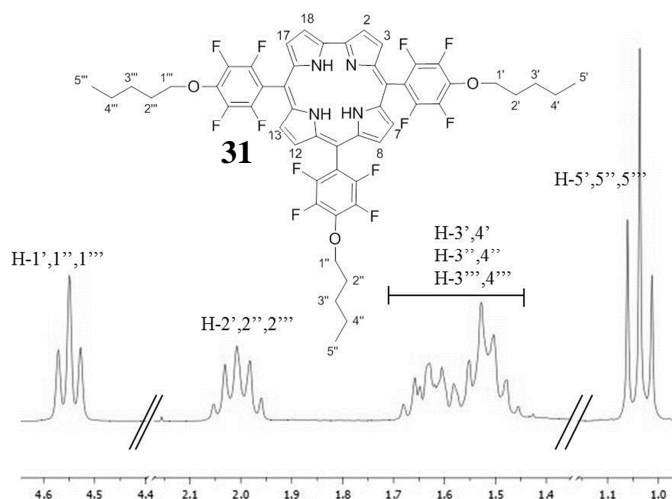


Figura 41 - Espectro de RMN de ¹H parcial do derivado **31** em CDCl₃.

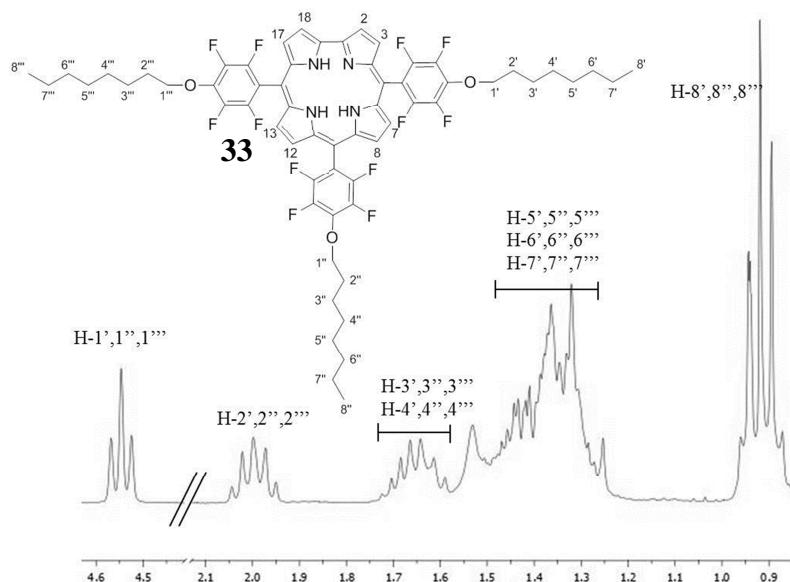


Figura 42 – Espectro de RMN de ¹H parcial do derivado **33** em CDCl₃.

Por fim, no espectro do derivado **33** surgem ainda os sinais gerados pela ressonância dos prótons dos grupos CH₂ ligados em quinta, sexta e sétima posições (H-5',5'',5''',6',6'',6''',7',7'',7''' e 7''') na forma de multipeto entre δ 1,50 e 1,25 ppm.

Atendendo às semelhanças estruturais entre os compostos complexados com Ga(III) – **30**, **32** e **34** -, os espectros obtidos são em tudo idênticos aos dos derivados não complexados, como se pode constatar pela análise da Tabela 7.

Tabela 7 – Resumo dos sinais da zona alifática dos espectros de RMN de ^1H de **30, **32** e **34**.**

Composto	δ (ppm)	Multiplicidade	H
30	4,54 – 4,47	multiplete	1', 1'', 1'''
	2,03	sexteto	2', 2'', 2'''
	1,25 - 1,18	multiplete	3', 3'', 3'''
32	4,58 – 4,51	multiplete	1', 1'', 1'''
	1,67 - 1,50	multiplete	2', 2'', 2''' 3', 3'', 3'''
	1,07 - 1,01	multiplete	4', 4'', 4'''
	0,89 - 0,85	multiplete	5', 5'', 5'''
34	4,57-4,51	multiplete	1', 1'', 1'''
	2,06 - 1,94	multiplete	2', 2'', 2''' 3', 3'', 3'''
	1,68 - 1,61	multiplete	4', 4'', 4'''
	1,47 - 1,41	multiplete	5', 5'', 5''' 6', 6'', 6'''
	1,39 - 1,35	multiplete	7', 7'', 7'''
	0,97 - 0,91	multiplete	8', 8'', 8'''

Os espectros de RMN de ^{19}F destes derivados, são todos muito semelhantes entre si e característicos de derivados tris-substituídos em posição *para*, ou seja, aparecem apenas os sinais relativos à ressonância dos átomos de flúor em posição *orto* e *meta*. Deste modo, a título de exemplo, apresenta-se apenas o espectro de RMN de ^{19}F do derivado **30** - Figura 43.

O sinal relativo aos átomos de flúor em posição *orto* surge num multiplete entre δ -163,41 e -163,54 ppm; os átomos de flúor em posição *meta* geram dois sinais de ressonância em dois multipletos entre δ -181,41 e -181,53 ppm e entre δ -181,63 e -181,75 ppm, sendo que o primeiro corresponde aos átomos dos grupos pentafluorofenilo nas posições 5 e 15 e o segundo aos átomos do grupo pentafluorofenilo na posição 10 do macrociclo.

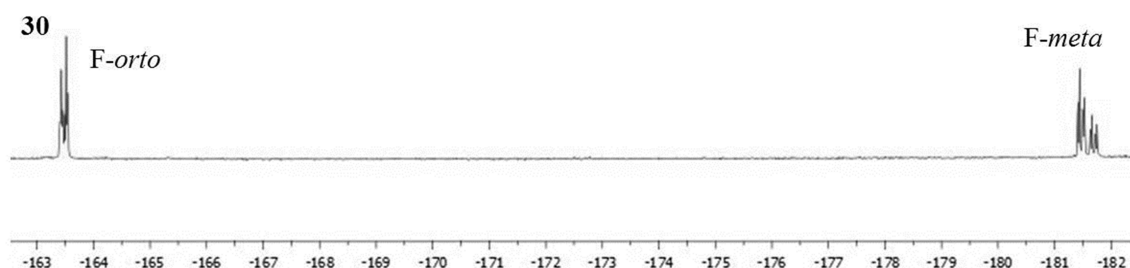


Figura 43 – Espectro de ^{19}F do derivado 30 em CDCl_3 .

A análise por espectrometria de massa destes derivados confirmou estarmos na presença dos derivados tris-substituídos, tendo-se obtido iões moleculares com razões m/z de 916 $[\text{M}]^+$, 1000 $[\text{M}]^+$ e 1126 $[\text{M}]^+$ para os derivados **29**, **31** e **33**, respectivamente, e iões moleculares de razões m/z de 982 $[\text{M-Py}]^+$, 1066 $[\text{M-Py}]^+$ e 1192 $[\text{M-Py}]^+$ para os compostos **30**, **32** e **34**, respectivamente, o que está de acordo com as estruturas propostas.

2.2.2.2. Reacções com o éter monometílico de trietilenoglicol (PEG)

Tendo em consideração os bons resultados obtidos com os álcoois de cadeia alifática e, tendo como objectivo desenvolver derivados com carácter hidrofílico, decidiu-se estender os estudos anteriores de substituição nucleófila ao éter monometílico do trietilenoglicol - Esquema 18.

Foram testadas várias condições reaccionais utilizando DMF como solvente, na presença de K_2CO_3 e chegando-se a atingir temperaturas de 60°C com adições sucessivas de PEG e tempo de reacção de 55 horas. Nestas condições reaccionais obtiveram-se principalmente, após purificação, misturas de isómeros mono-substituídos (m/z 941 $[\text{M}+\text{H}]^+$) e cada um dos isómeros bis-substituídos (m/z 1085 $[\text{M}+\text{H}]^+$), identificados por EM - Figura 44.

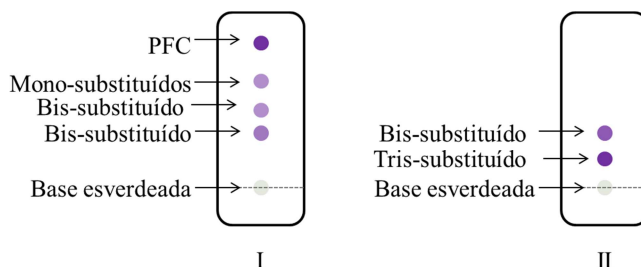
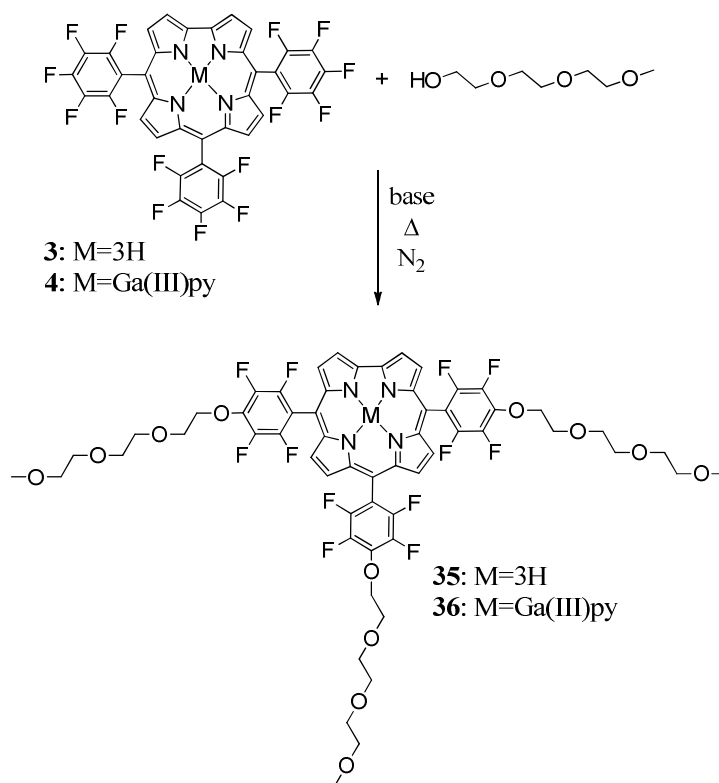


Figura 44 – Representação dos TLC's das reacções com as primeiras (I) e com as segundas (II) condições testadas.

A adição de um excesso de PEG (23 equivalentes) no início e mantendo a reacção a 60°C durante 22 horas permitiu obter maioritariamente o derivado tris-substituído **35** (m/z 1229 $[M+H]^+$) e alguma quantidade dos derivados bis-substituídos, após purificação cromatográfica.



Esquema 18 – Esquema reaccional para a síntese do 5,10,15-tris[2,3,5,6-tetrafluoro-4-(3,6,9-trioxadeciloxi)fenil]corrol **35** e do 5,10,15-tris[2,3,5,6-tetrafluoro-4-(3,6,9-trioxadeciloxi)fenil]corrolatogálio(III)(piridina) **36**.

Após várias tentativas para melhorar o rendimento do derivado tris-substituído, consideraram-se estas condições como sendo as condições óptimas, tendo em conta a formação apenas dos derivados bis-substituídos, para além do derivado tris-substituído. Apesar de durante a reacção quase não se verificar a formação de produtos de degradação, o derivado tris-substituído é muito instável, decompondo-se com facilidade e originando compostos de cor esverdeada, mesmo protegido da luz e do ar. Desta forma, não foi possível calcular o rendimento da reacção.

As mesmas condições reaccionais foram testadas na presença do complexo de gálio(III). Verificou-se que a reacção com o corrol **4** é mais morosa do que a reacção com o corrol **3**, sendo necessárias, aproximadamente, 41 horas. Contudo, verificou-se a formação quase exclusiva do derivado tris-substituído (acompanhada pela formação de

vários produtos de degradação), o que foi confirmado por RMN de ^1H e de ^{19}F e por EM (m/z 1295 $[\text{M-py}+\text{H}]^+$).

Verificou-se que o derivado **36**, apesar de ser susceptível de purificação cromatográfica, se revelou muito instável, não se mantendo puro durante muito tempo, mesmo protegido da luz e do ar. Desta forma, o rendimento para a obtenção de **36** foi de 15%.

2.2.2.2.1. Caracterização estrutural

Atendendo a que os dois derivados tris-substituídos **35** e **36** são extremamente sensíveis e se degradam com bastante facilidade, não foi possível o cálculo dos respectivos valores de coeficiente de extinção. Porém, na Figura 45 apresentam-se os respectivos espectros de absorção em DMSO.

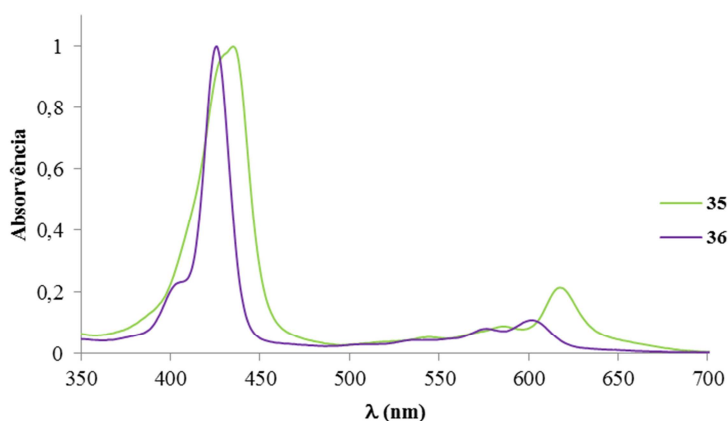


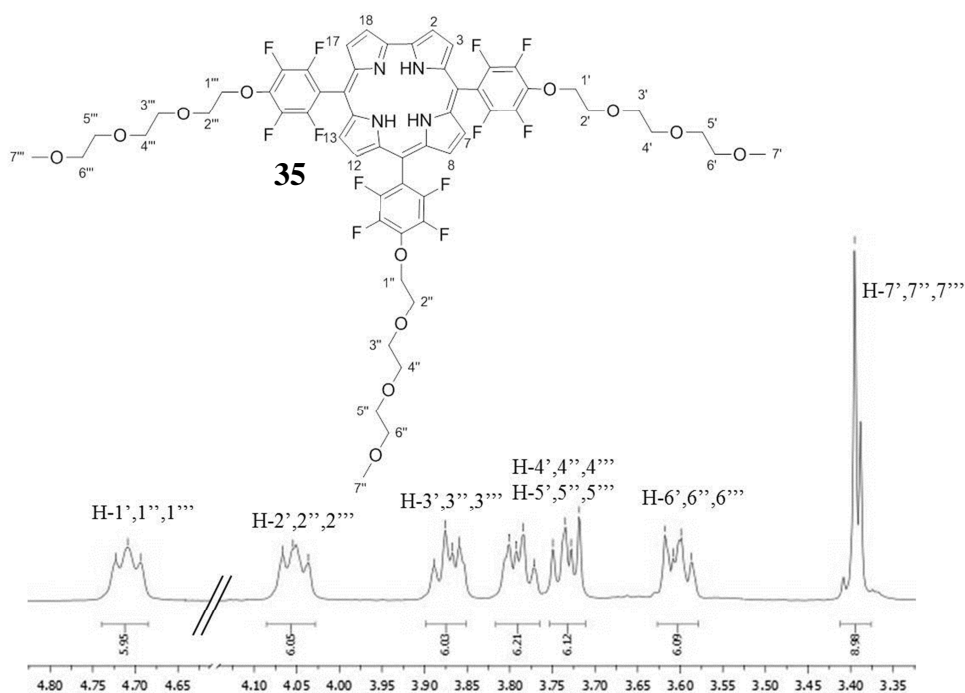
Figura 45 – Espectros de absorção de visível normalizados dos derivados **35** e **36** em DMSO.

A análise dos espectros de RMN de ^1H destes derivados revelou na zona aromática os sinais relativos aos prótons β -pirrólicos característicos - Tabela 8 – e na zona alifática os sinais relativos à ressonância dos prótons do PEG substituinte (Figura 46 e Figura 47).

Tabela 8 - Resumo dos sinais da zona aromática dos espectros de RMN de ^1H de 35, 36.

Composto	δ (ppm)	Multiplicidade	H
35	9,07	duplete	2 , 18
	8,78	duplete	7 , 13
	8,62 - 8,54	múltiplo	3, 8, 12, 17
36	9,20	duplete	2 , 18
	8,87	duplete	7 , 13
	8,80	duplete	3, 17
	8,65	duplete	8, 12

Como se pode verificar, os dois espectros de RMN de ^1H são muito semelhantes entre si. Como no caso dos álcoois, os prótons pertencentes ao grupo CH_2 adjacente ao átomo de oxigénio são os mais desprotegidos, surgindo, por isso, o sinal gerado pela sua ressonância a campos mais baixos (cerca de 4,7 ppm). Os sinais de ressonância que surgem a campos mais elevados (entre δ 3,40 - 3,37 ppm), na forma de singletos, são relativos aos prótons dos grupos metilo terminais, que se encontram mais escudados do que todos os outros, como seria de esperar.

Figura 46 – Espectro de RMN parcial do derivado 35 em CDCl_3 .

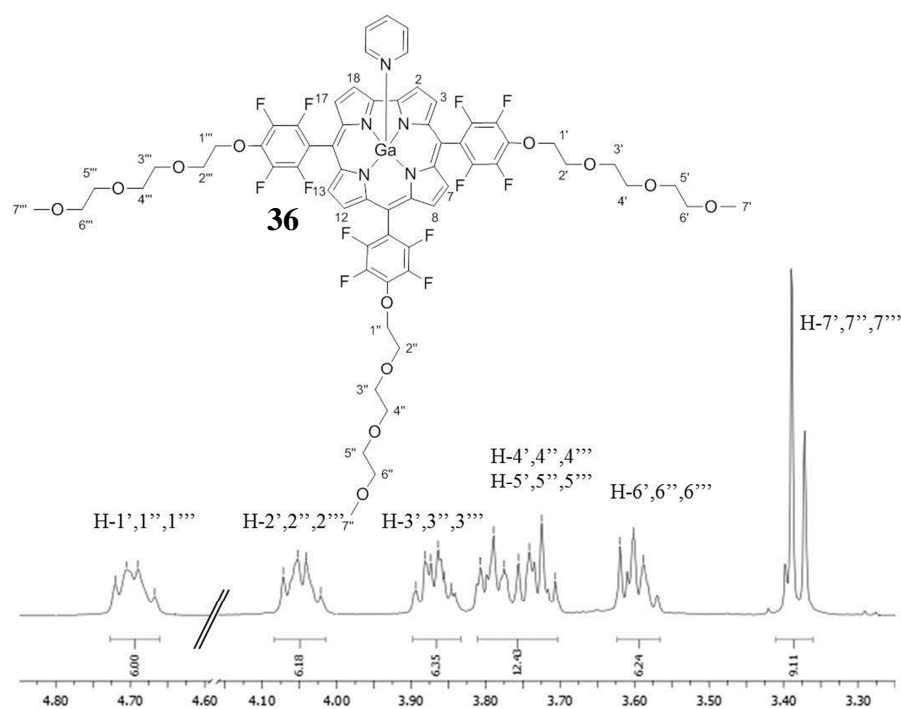


Figura 47 – Espectro de RMN de ^1H parcial do derivado 36 em CDCl_3 com gotas de $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

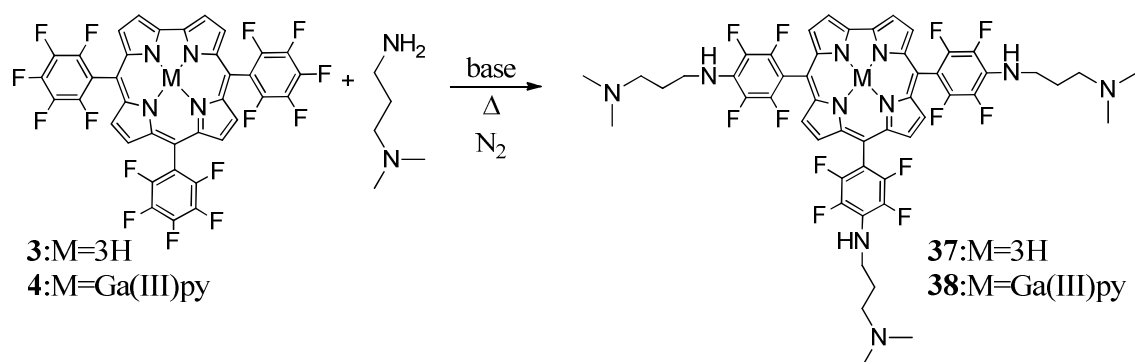
Entre estes sinais, surgem os sinais dos restantes grupos CH_2 na forma de multipletos, como se conclui pela observação dos respectivos espectros de RMN.

À medida que os prótons se encontram mais afastados do macrociclo o efeito sacador de electrões vai sendo cada vez menos sentido, logo, a sua densidade electrónica é superior relativamente aos outros, o que faz com que surjam a desvios químicos inferiores, isto é, a campos mais elevados. Também os espectros de RMN de ^{19}F de ambos os compostos permitiram, mais uma vez, concluir que os três átomos de flúor em posição *para* haviam sido substituídos, observando-se apenas os sinais relativos à ressonância dos átomos de flúor em posição *orto* e *meta*.

A espectrometria de massa confirmou as estruturas propostas para **35** e **36**, na medida em que desta análise resultaram iões moleculares com razões m/z de 1229 $[\text{M}+\text{H}]^+$ e 1294 $[\text{M}-\text{Py}-\text{H}]^+$, respectivamente.

2.2.2.3. Reacções com a 3-dimetilamino-1-propilamina

Este estudo envolveu ainda a preparação do derivado corrólico tris-substituído com a 3-dimetilamino-1-propilamina (DMAPA) - Esquema 19 - com o objectivo de futura preparação de um derivado tri-catiónico, em que a cadeia alquílica poderia facilitar a interacção do fotossensibilizador com a membrana celular das bactérias.



Esquema 19 – Esquema reaccional da síntese dos derivados 37 e 38.

A reacção com a DMAPA e o corrol **3** ocorreu na presença de K_2CO_3 em DMSO a $80^\circ C$ durante 2 a 3 horas. O produto maioritário obtido, de cor roxa, revelou, por EM (m/z 1042 M^{+}) ser o derivado tris-substituído, embora se tenha observado também a presença do derivado bis-substituído e alguma decomposição.

O derivado tris-substituído **37** foi purificado por cristalização e a análise do espectro de massa confirmou estarmos na presença apenas deste derivado, que foi obtido com um rendimento de 58%.

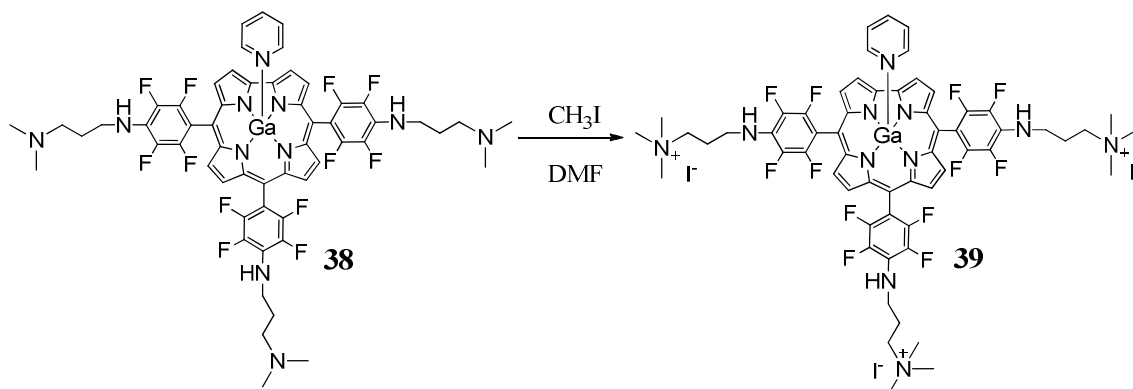
Foram utilizadas as mesmas condições reaccionais para testar a reacção com o corrol **4**, tendo-se observado ao fim de 2,5 horas a existência de dois compostos de cor rosa no TLC (com o desaparecimento do corrol **4**), e em que o composto de r_f inferior se encontrava numa proporção francamente superior. Após o procedimento habitual de tratamento da mistura reaccional, precipitou-se o composto maioritário numa mistura de diclorometano e hexano. A posterior filtração do precipitado e análise por EM confirmou estarmos unicamente na presença do derivado pretendido (m/z 1109 $[M-py+H]^+$). O rendimento da síntese de 5,10,15-{4-[3-(dimetilamino)propilamino]-2,3,5,6-tetrafluorofenil}corrolatogálio(III)(piridina) **38** foi de 63%.

Note-se que quando se utilizou um grande excesso de nucleófilo (≈ 60 equivalentes) verificou-se uma enorme dificuldade de extracção da fase orgânica após a lavagem da mistura reaccional.

2.2.2.3.1. Metilação do 5,10,15-{4-[3-(dimetilamino)propilamino]-2,3,5,6-tetrafluorofenil}corrolatogálio(III) **38**

Como já foi referido, a síntese de **38** teve como objectivo a posterior metilação dos átomos de azoto terminais, permitindo, desta forma a formação de um derivado tri-

catiónico. Assim, a reacção de metilação decorreu de acordo com o Esquema 20 e a mistura reaccional foi precipitada com éter etílico.



Esquema 20 - Esquema reaccional da síntese de tri-iodeto de 5,10,15-tris[4-(3-trimetilamino-1-propilamino)-2,3,5,6-tetrafluorofenil]corrolatogálio(III)(piridina) **39.**

Contudo, a caracterização do derivado que se supôs ser o **39** resultou em espectros de RMN de ^1H e de ^{19}F confusos e pouco definidos. Para além disso, os resultados da análise por EM também não são concordantes com o derivado esperado.

Assim, sugere-se a existência de agregados inter-moleculares e ressalva-se a possibilidade de metilação do átomo de azoto que estabelece a ligação com o anel pentafluorofenilo, originando uma mistura de diferentes moléculas.

Posto isto, o derivado obtido nesta reacção não foi objecto de estudos fotofísicos nem biológicos.

2.2.2.3.2. Caracterização estrutural

Os derivados **37** e **38** foram sujeitos a análise espectroscópica de UV-Vis, espectroscopia de RMN e espectrometria de massa.

Na Figura 48 apresentam-se os espectros de absorção UV-Vis dos derivados **37** e **38** e dos respectivos precursores, **3** e **4**. Tal como em casos anteriores verifica-se que a tris-substituição das moléculas de corrol quase não afecta as suas características de absorção - Tabela 9.

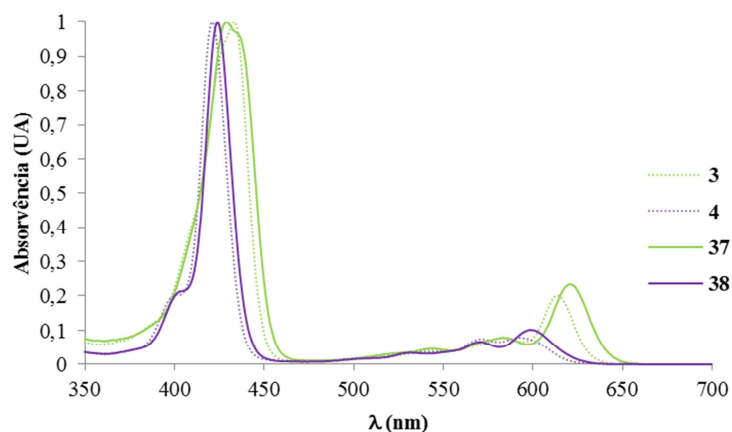


Figura 48 - Espectros de absorção de visível normalizados dos derivados 37e 38 e dos respectivos precursores, 3 e 4, em DMSO.

Em ambos os casos se observa um ligeiro desvio batocrômico dos máximos de absorção, relativamente aos precursores, sendo este desvio mais evidente no caso de **37**.

Tabela 9 – Máximos de absorvência e coeficientes de extinção molar (ϵ , $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) dos derivados 37 e 38 e dos corróis precursores 3 e 4 em DMSO.

Composto	Banda Soret (nm)	$\log \epsilon$	Bandas Q (nm)	$\log \epsilon$
3	434	5,20	543	4,00
			584	4,20
			614	4,40
4	423	5,42	574	4,39
			592	4,40
37	430	5,38	545	4,44
			585	4,54
			622	4,84
38	426	5,40	577	4,27
			609	4,50

Relativamente aos espectros de RMN de 1H e de ^{19}F , estes apresentam pouca resolução (Figura 49), o que poderá estar relacionado com fenómenos de agregação. Porém, são assinaláveis os sinais gerados pela ressonância dos prótons β -pirrólicos, que surgem na mesma zona de desvios químicos a que surgem os dos derivados anteriores - no caso de **37** entre δ 9,09 – 8,56 ppm e no caso de **38** entre δ 9,16 – 8,68 ppm. Para além disso, surgem na zona alifática os sinais relativos à ressonância dos prótons da cadeia alquímica. Assim, os prótons ligados ao átomo de carbono imediatamente ligado ao átomo de azoto são os que geram sinais a campos mais baixos, encontrando-se,

portanto, mais desprotegidos; os sinais que surgem a campos mais elevados são os que correspondem à ressonância dos prótons dos grupos metileno nas posições 2', 2'' e 2''', encontrando-se ainda mais escudados do que os prótons pertencentes aos grupos metilo terminais

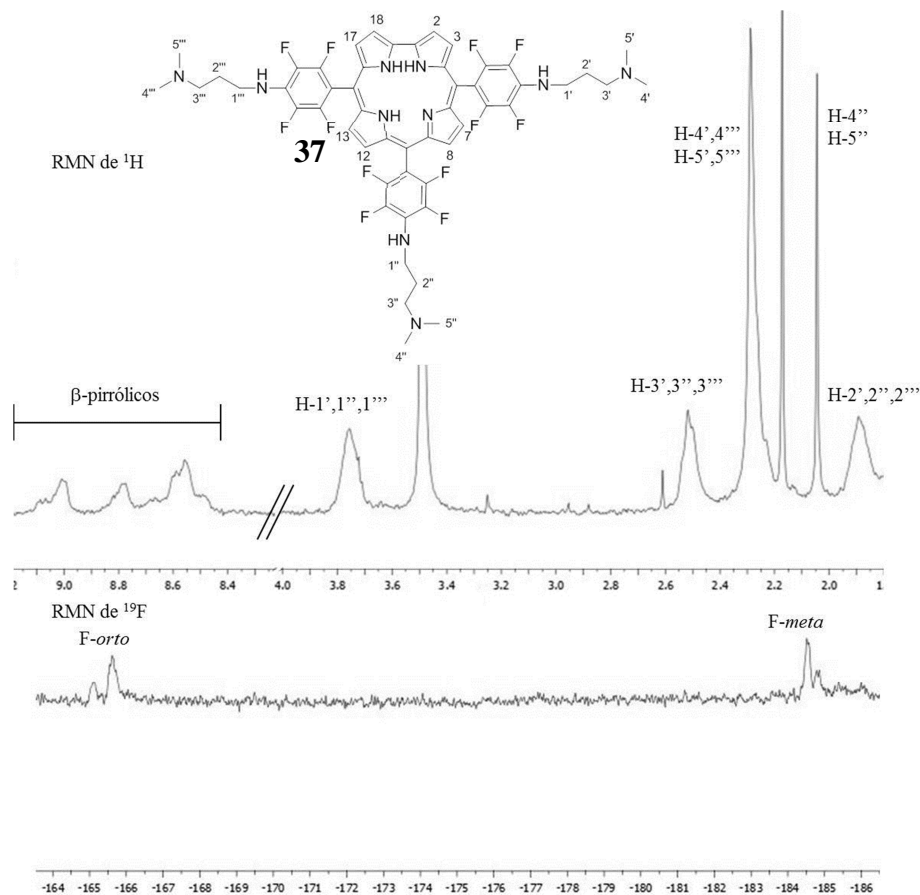


Figura 49 – Espectros de RMN de ^1H e de ^{19}F do derivado **37** em CDCl_3 .

A caracterização por EM confirma estarmos na presença dos derivados **37** e **38**, na medida em que se obtiveram iões moleculares com razões m/z 1043 $[\text{M}+\text{H}]^+$ e m/z 1108 $[\text{M-Py}]^+$, respectivamente. Na Figura 50 apresentam-se os espectros de massa destes dois derivados.

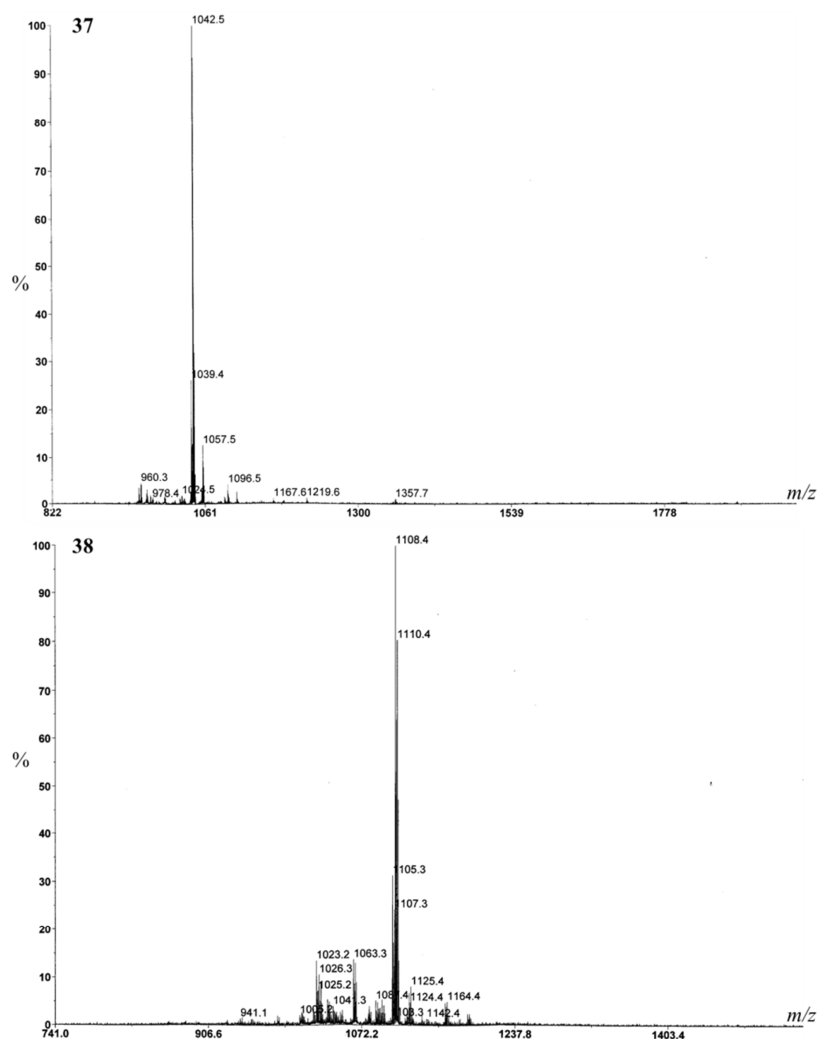


Figura 50 – Espectros de massa de MALDI/TOF/TOF dos derivados 37 e 38.

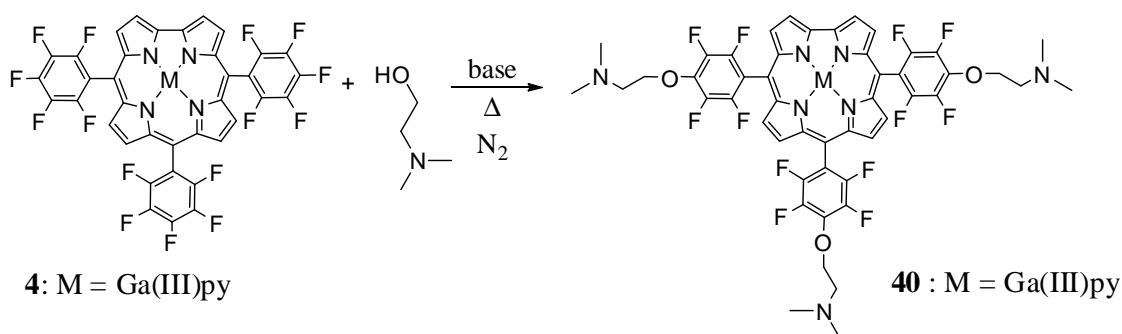
2.2.2.4. Reações com a *N,N*-dimetiletanolamina

Tendo em conta os resultados da substituição nucleófila com a 3-dimetilamino-1-propilamina considerou-se a realização da reacção de substituição com a *N,N*-dimetiletanolamina (DMEA) - Esquema 21.

A DMEA é um composto de estrutura semelhante à DMAPA, contudo, com menos um átomo de carbono e a ligação aos grupos pentafluorofenilo do macrociclo corrólico seria estabelecida por um átomo de oxigénio, ou seja, teríamos uma ligação do tipo éter ao invés de uma ligação do tipo amina. A posterior metilação do derivado tris-substituído permitir-nos-ia formar um composto com três cargas positivas.

Uma vez que se observou que os derivados complexados apresentavam maior estabilidade do que os derivados livres, a reacção de substituição nucleófila foi apenas realizada com o complexo de gálio(III) **4**.

Assim, utilizaram-se 10 equivalentes de DMEA, relativamente a **4**, na presença de K_2CO_3 em excesso em DMSO; a temperatura utilizada foi de $100^\circ C$.



Esquema 21 – Esquema reaccional da tentativa de síntese do derivado 40.

Após 1,5 horas desde o início da reacção verificou-se a existência de três manchas de cor rosa, para além do corrol **4** (que ainda era o componente maioritário). A reacção foi deixada nestas condições até todo o reagente de partida ter sido consumido, o que aconteceu ao fim de 23 horas. Nesta altura, o TLC revelou quatro manchas de cor rosa e uma base esverdeada escura - Figura 51.

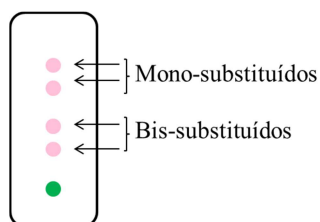


Figura 51 – Representação do TLC da mistura reaccional acima descrita ao fim de 23 horas.

Procedeu-se ao tratamento habitual da mistura reaccional, o que resultou numa quantidade diminuta de fase orgânica recuperada, pelo que todo o conteúdo da mistura reaccional recuperado foi submetido a análise por EM sem separação prévia. Do espectro resultante desta análise identificou-se um pico com razão m/z 931 $[M-Py]^+$, correspondente aos derivados mono-substituídos (estrutura I, Figura 52) e outros picos resultantes da sua fragmentação; embora não se tenha identificado o pico relativo ao ião molecular dos derivados bis-substituídos, identificaram-se alguns picos que poderão corresponder à fragmentação destes derivados – por exemplo, m/z 957 $[M-Py-C_3H_9]^+$, estrutura II, Figura 52.

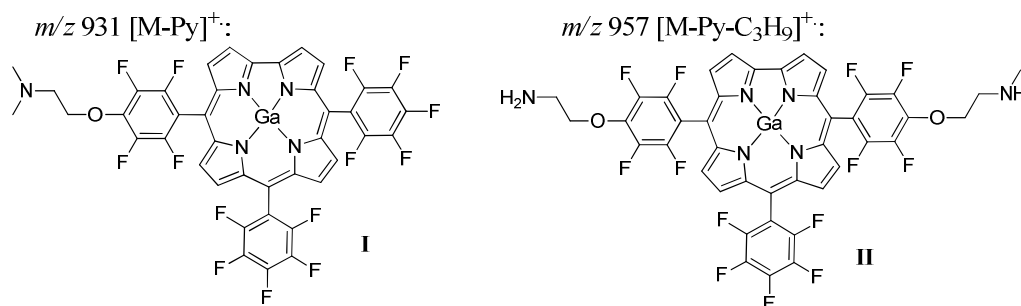


Figura 52 – Estrutura do derivado mono-substituído (I) e estrutura proposta de um possível fragmento do derivado bis-substituído (II) obtidos na análise por EM da mistura reaccional anterior. (Por razões de simplificação apresenta-se apenas um dos derivados mono-substituídos e um dos derivados bis-substituídos possíveis, contudo, sugere-se que exista uma mistura dos quatro isómeros.)

Assim, a reacção foi repetida nas mesmas condições, porém, procedendo-se à geração do alcóxido (por adição de DMEA, K_2CO_3 e DMSO em primeiro lugar e durante 15 minutos) antes da adição do corrol **4**. Numa tentativa de forçar a tris-substituição, a reacção permaneceu nas mesmas condições durante 66 horas e foi terminada devido à ausência de reagente de partida (corrol **4**). O TLC da mistura reaccional apresentava quatro manchas de cor rosa. Após *work-up* da reacção, estas quatro fracções foram separadas por cromatografia preparativa e analisadas por EM. Os resultados desta análise levaram-nos a crer que a primeira fracção correspondia ao derivado mono-substituído, porém, as duas fracções seguintes deram origem as espectros de massa iguais com razões m/z de 883 e 885. Tendo em conta estes resultados sugere-se que o derivado **I** da Figura 53 seja formado no meio reaccional aquando da libertação do grupo $-HN(CH_3)_2$ e que o derivado **II** da mesma figura se forme na fonte de ionização a partir do derivado **I**.

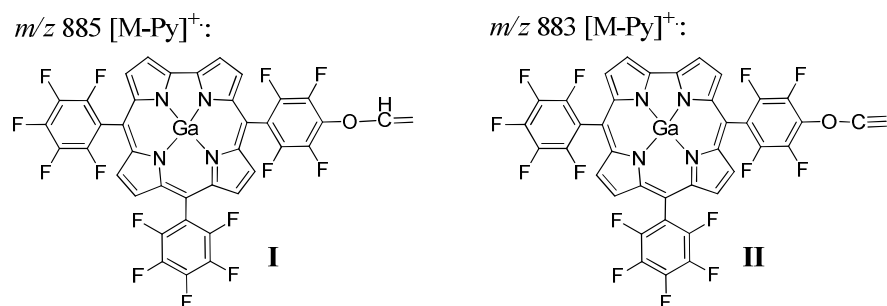


Figura 53 – Estruturas propostas com base nas razões m/z obtidas por análise de EM dos compostos sintetizados. (Por razões de simplificação apresenta-se apenas um dos derivados mono-substituídos possível, contudo, sugere-se que exista uma mistura dos dois isómeros.)

Da análise da última fracção recolhida resulta um espectro com dois picos com razões m/z 893 e m/z 895, que não foram, até ao momento, identificados.

Não se conseguiu sintetizar o derivado **40** pretendido em tempo útil, porém, considera-se que este e o seu derivado catiónico poderão ter interesse como potenciais fotossensibilizadores.

2.3. Conclusões

Os resultados obtidos na preparação de novos derivados corrólicos através de reacções de substituição nucleófila mostraram que, efectivamente, o átomo de flúor em posição *para* nos grupos pentafluorofenilo dos macrociclos **3** e **4** é bastante susceptível de sofrer ataque nucleófilo na presença de uma base. Assim, foram preparados derivados tris-substituídos, na posição referida, por nucleófilos de tipo aromático e alifático.

No caso dos nucleófilos aromáticos utilizaram-se derivados da piridina com grupos tiol, amina e hidroxilo. Verificou-se que a reactividade é extremamente dependente do heteroátomo e, até ao momento, apenas se conseguiram obter os derivados tris-substituídos com a 4-mercaptopiridina e com a 4-hidroxipiridina.

No que diz respeito aos derivados alifáticos, foram preparados derivados tris-substituídos com álcoois com cadeias carbonadas de diferentes tamanhos (C3, C5 e C8), com o polietilenoglicol (PEG 3) e com a 3-dimetilamino-propilamina. Foram ainda testadas reacções de substituição nucleófila com a *N,N*-dimetiletanolamina.

O rendimento destas reacções de substituição variou consoante a reactividade do nucleófilo, tendo-se verificado que nas reacções com nucleófilos alifáticos os derivados tris-substituídos são obtidos com melhores rendimentos. Verificou-se também que, no geral, as reacções com o complexo de gálio dão origem a rendimentos superiores.

Os derivados **19** e **22**, os únicos com possibilidade de alquilação obtidos em quantidades suficientes para tal, foram, posteriormente, submetidos a reacções de metilação, tendo-se obtido os respectivos derivados tri-catiónicos **20** e **23** com interesse para uma potencial utilização a nível biológico.

Capítulo III

Estudos Fotofísicos

3. Estudos fotofísicos

As propriedades fotofísicas são de extrema importância na avaliação de um potencial fotossensibilizador. Assim, foram realizados estudos fotofísicos a alguns dos novos derivados corrólicos sintetizados e o resultado destes estudos será apresentado neste capítulo. Para além de terem sido definidos os espectros de emissão dos compostos estudados, foram também determinados alguns parâmetros fotofísicos, nomeadamente, tempo de vida de fluorescência, τ_{fl} , tempo de vida do estado excitado tripleto, τ_T , rendimentos quânticos de fluorescência, ϕ_{fl} , e de geração de oxigénio singuleto, ϕ_{Δ} . Estes parâmetros foram determinados pelo grupo da Professora Beate Röder do Instituto de Física da Universidade Humboldt de Berlim fruto de um trabalho de parceria desenvolvido com o Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Os processos fotofísicos a ter em conta encontram-se representados no seguinte diagrama de Jablonski - Figura 54 -, onde, as setas preenchidas representam transições radiativas e as setas a pontilhado representam processos não radiativos.

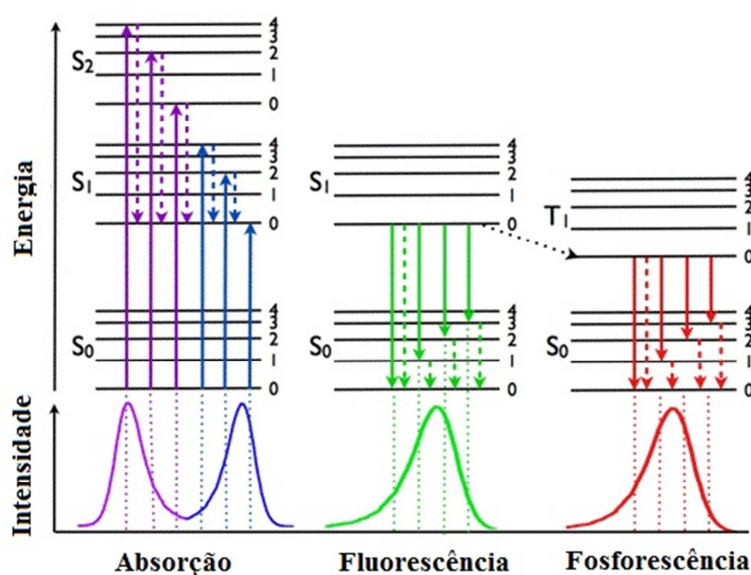


Figura 54 – Diagrama de Jablonski modificado.^[90]

Uma molécula no estado fundamental, S₀, ao absorver um fóton promove a passagem de um dos seus electrões para uma orbital de maior energia e pode ocupar qualquer um dos estados excitados singuleto S_n, desde que possua energia para tal. Se n>1 podem ocorrer processos não radiativos, designados por conversão interna, que conduzem a molécula excitada ao estado excitado singuleto de menor energia, S₁.

A relaxação $S_1 \rightarrow S_0$ pode ocorrer via conversão interna ou através da emissão de fótons – fluorescência. A fluorescência é um processo espontâneo que se caracteriza pela emissão de luz em determinada zona do espectro electromagnético por parte de um composto que absorveu energia a diferente comprimento de onda (inferior, na maioria dos casos). A emissão de fluorescência ocorre sempre a partir de S_1 , pelo que, desde que haja apenas uma espécie no estado fundamental, as suas características de fluorescência não dependem do comprimento de onda a que a molécula é excitada.

A fluorescência de determinada espécie pode ser influenciada pela polaridade da molécula, existência de pontes de hidrogénio, temperatura, pressão, viscosidade e pH do meio, presença de moléculas que actuem como *quenchers* ou pelo potencial eléctrico e iónico do meio.^[91]

Para além da fluorescência, outros processos que promovam o regresso da molécula excitada ao estado fundamental podem ocorrer, tais como a conversão interna, cruzamento inter-sistemas, $S_1 \rightarrow T_1$, (que pode ser procedido pela emissão de fosforescência), transferência de carga intermolecular ou alterações conformacionais. Simultaneamente podem ocorrer interações de outras moléculas com a molécula no estado excitado que podem competir com os processos anteriormente referidos – transferência de electrão ou de protão ou transferência de energia são os mais importantes.^[91] A geração de oxigénio singuleto, 1O_2 , fulcral para um bom fotossensibilizador, ocorre por um destes processos de transferência de energia.

Estes processos alternativos de perda de energia e consequente retorno ao estado fundamental podem competir com a emissão de fluorescência, caso ocorram numa escala de tempo comparável com o tempo de vida que as moléculas permanecem no estado excitado.

Alguns parâmetros, como sejam os tempos de vida e os rendimentos quânticos, serão explicados no próximo ponto, recorrendo ao exemplo prático dos corróis precursores.

3.1. Propriedades fotofísicas dos corróis precursores 3 e 4

Serão apresentados em primeiro lugar os resultados do estudo realizado com os corróis **3** e **4** que, sendo os corróis precursores, serão utilizados como referência. Os espectros de emissão foram obtidos a partir de uma solução do respectivo composto em DMSO e em todos os casos utilizou-se um comprimento de onda de excitação próximo

do máximo da banda Soret correspondente (a intensidade máxima de absorção, de modo a minimizar a concentração de solução necessária e evitar agregação).

Como se pode verificar na Figura 55 e na Figura 56, os dois compostos (**3** e **4**) apresentam espectros de emissão relativamente simétricos aos respectivos espectros de absorção e tanto um como o outro emitem, sensivelmente, na mesma zona – o corrol **3** apresenta um máximo de emissão a 612 nm e o corrol **4** apresenta um máximo de emissão a 617 nm.

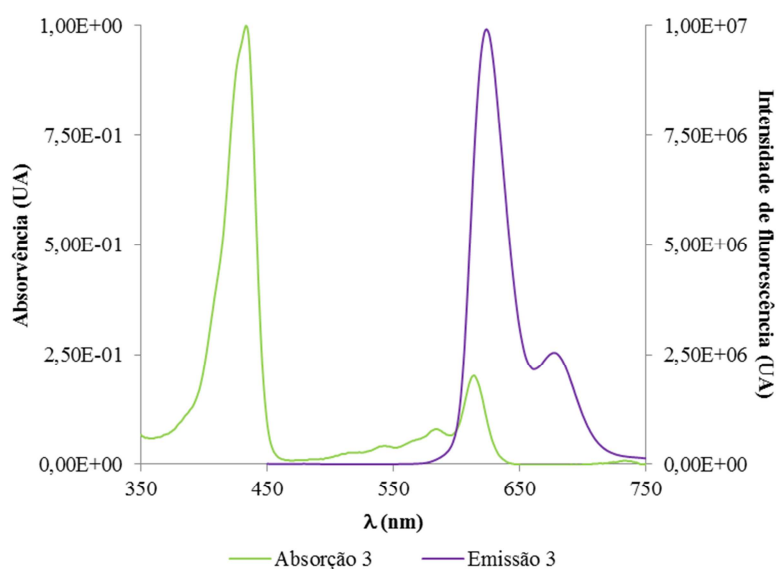


Figura 55 - Espectros de absorção e emissão do corrol 3 em DMSO.

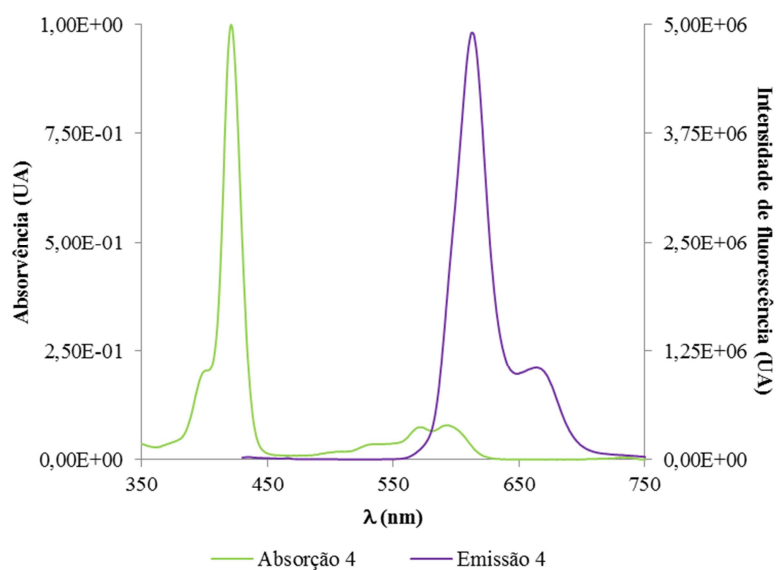


Figura 56 - Espectros de absorção e de emissão do corrol 4 em DMSO.

O corrol **4** apresenta um desvio de Stokes superior (7443 cm^{-1}) ao desvio de Stokes do corrol não complexado **3** (6702 cm^{-1}) - Tabela 10. O desvio de Stokes é a diferença entre o máximo de emissão e o máximo de absorção de determinado composto, expresso em número de onda (cm^{-1}), e reflecte a energia perdida entre a absorção e a emissão de fotões.^[91] Assim, conclui-se que, relativamente ao corrol **3**, o corrol **4** perde mais energia entre o processo de absorção e de emissão de fotões.

A título de curiosidade, apresenta-se na Figura 57 a emissão de luz (fluorescência) observada aquando da irradiação de soluções de **3** e **4** com luz de 254 nm.

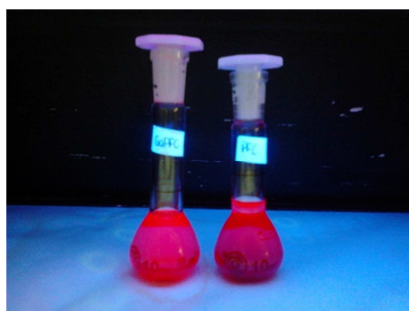


Figura 57 – Soluções dos corrols **4** e **3**, respectivamente, em DMSO irradiadas com luz de 254 nm.

A Tabela 10 reúne algumas das propriedades fotofísicas dos compostos **3** e **4**.

Tabela 10 – Propriedades fotofísicas dos compostos **3** e **4** em DMF.

Composto	λ_{fl}^* (nm)	τ_{fl} (ns)*		τ_{T}^1 (μs)	τ_{T}^2 (μs)	ϕ_{fl}	ϕ_{Δ}	Desvio de Stokes ³ (cm^{-1})
3	612	4,00 (63%)	0,07 (37%)	0,820	0,88	0,48	0,47	6702
4	617	2,82 (86,5%)	0,18 (13,5%)	2,992	1,54	0,44	0,59	7443

*Estudos realizados em DMSO

¹Tempo de vida do estado excitado tripleto determinado por *Laser Flash Photolysis*

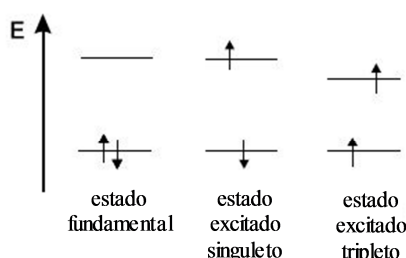
²Tempo de vida do estado excitado tripleto determinado por *Time-resolved singlet oxygen luminescence*

³Desvio de Stokes calculado entre o número de onda do máximo de emissão e o número de onda do máximo de absorção da banda Soret.

O tempo de vida de fluorescência, τ_{fl} , traduz-se no tempo que uma molécula permanece no estado excitado antes de emitir um fotão. Este parâmetro é sensível e dependente do ambiente químico em que as moléculas se encontram. Os corrols **3** e **4**

apresentam dois tempos de vida de fluorescência cada, o que será indicativo da existência de dois estados da mesma molécula, sabendo que existe apenas uma espécie em solução. Desta forma, sugere-se que a explicação para os dois tempos de vida esteja relacionada com a formação de agregados intermoleculares. É sabido que o maior tempo de vida corresponde ao estado monomérico; assim, no caso do corrol **3** em DMSO, 63% das moléculas encontram-se no estado monomérico e esta percentagem aumenta para 86,5% no caso do corrol **4**.

Voltando a ter em conta o diagrama de Jablonski - Figura 54 – se a molécula excitada não decair por emissão de fóton poderá sofrer um processo de cruzamento inter-sistemas, onde ocorre inversão do *spin* do electrão excitado, passando a encontrar-se no estado excitado tripleto, T_1 - Esquema 22.



Esquema 22 – Spins dos electrões nos diferentes estados de energia da molécula.

À temperatura ambiente e em solução, os processos de decaimento não radiativo a partir do estado excitado tripleto predominam relativamente ao processo de emissão de luz, fosforescência. A transição $T_1 \rightarrow S_0$ é proibida (contudo, pode ser observada devido ao acoplamento *spin*-orbital) e, por isso, a taxa de emissão de radiação é muito baixa. Assim, o tempo de vida do estado excitado tripleto é, normalmente, longo, na ordem dos μs , e de extrema importância como estado inicial para a ocorrência de reacções de transferência electrónica e de energia.

Os tempos de vida do estado excitado tripleto foram determinados através de dois métodos. O primeiro, *Laser flash photolysis*, é um método mais preciso, no qual uma molécula é excitada por um pulso de luz de um laser provocando um aumento da população em níveis de energia superiores ao estado fundamental (ou seja, preenchendo o estado excitado tripleto devido à ocorrência de cruzamento inter-sistemas). De seguida, a absorção das espécies no estado excitado tripleto, passando a estados de energia superiores, é detectada com um LED. O *setup* detecta a transmissão da luz do

LED através da amostra excitada ao longo do tempo – a transmissão aumenta à medida que o estado excitado tripleto vai ficando despopulado.^[73]

Por outro lado, o *setup* utilizado no segundo método (*Time-resolved singlet oxygen luminescence*) detecta a luminescência do oxigénio singuleto, que ocorre perto dos 1270 nm. É um método indirecto em que a amostra é excitada por um laser no seu máximo de absorção e, assumindo que ocorre ISC e transferência de energia para o oxigénio molecular, a luminescência do oxigénio singuleto é detectada ao longo do tempo. Do tratamento dos dados recolhidos obtêm-se dois tempos de vida, um relativo ao estado excitado tripleto e outro relativo ao oxigénio singuleto. O resultado da medição por *Laser Flash Photolysis* serve como discriminatório para, por comparação se identificar qual o tempo de vida atribuído ao estado excitado tripleto e ao oxigénio singuleto.^[73]

Analisando os resultados obtidos, verifica-se que a complexação do corrol **3** com gálio(III) resulta num aumento do tempo de vida do estado excitado tripleto.

Em relação ao rendimento quântico de fluorescência, ϕ_f – razão entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos - verifica-se que em DMF os corróis **3** e **4** apresentam valores muito próximos entre si (0,48 e 0,44, respectivamente). Este comportamento é contrário ao reportado em tolueno, onde se verifica que os corrolatos de gálio(III) apresentam rendimentos quânticos de fluorescência significativamente superiores aos do corrol livre.^[27b] Os rendimentos quânticos de fluorescência, ϕ_f , dos corróis, na generalidade, são superiores aos das respectivas porfirinas.^[25] Especificamente, para o caso da porfirina análoga ao corrol **3** o rendimento quântico de fluorescência ronda os 0,14, uma diferença significativa.

No caso do rendimento quântico de geração de oxigénio singuleto, ϕ_Δ - quantidade de moléculas de $^1\text{O}_2$ geradas pela absorção de um fóton - observa-se um valor superior para o caso do complexo de gálio(III) **4** (0,59) relativamente ao corrol livre **3** (0,47). Estes resultados estão de acordo com o reportado na literatura.^[27b]

3.2. Derivados substituídos com nucleófilos aromáticos

3.2.1. Características fotofísicas dos derivados 18, 19, 20, 22 e 23

Foram então realizados estudos das propriedades fotofísicas de alguns dos derivados novos sintetizados e será feita uma comparação dos resultados obtidos com os resultados obtidos para os coróis precursores **3** e **4**.

Os espectros de absorção e de emissão dos derivados **18**, **19**, **20**, **22** e **23** encontram-se representados na Figura 58, Figura 59 e Figura 60. A observação destes espectros permite verificar que, em todos os casos, o espectro de emissão apresenta um comportamento simétrico em relação ao respectivo espectro de absorção.

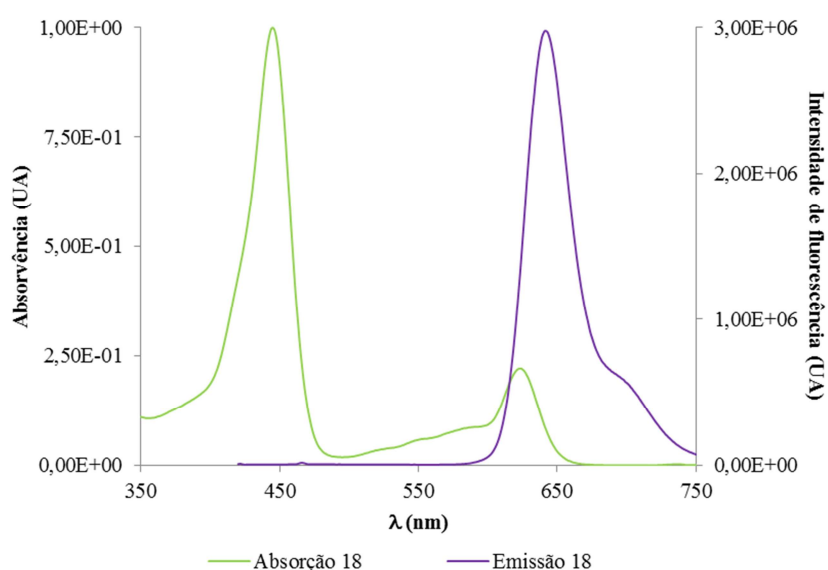


Figura 58 – Espectros de absorção e de emissão do derivado 18 em DMSO.

O derivado **18** apresenta um máximo de emissão ao mesmo comprimento de onda de **3**, 612 nm, e um desvio de Stokes de 6132 cm^{-1} , inferior ao apresentado pelo corol precursor (6702 cm^{-1}).

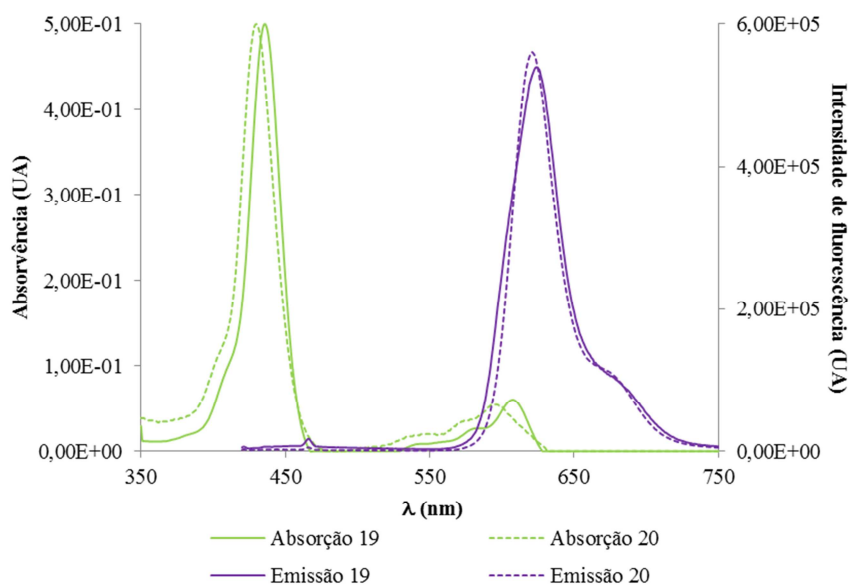


Figura 59 - Espectros de absorção e de emissão dos derivados **19** e **20** em DMSO.

Como já havia sido referido, no caso do derivado catiónico **20** existe um ligeiro desvio dos máximos de absorção para comprimentos de onda inferiores, relativamente ao derivado neutro **19**. Este comportamento também se verifica no espectro de emissão, sendo que os dois compostos apresentam máximos de emissão muito próximos (624 nm para o composto **19** e 621 nm para o composto **20**).

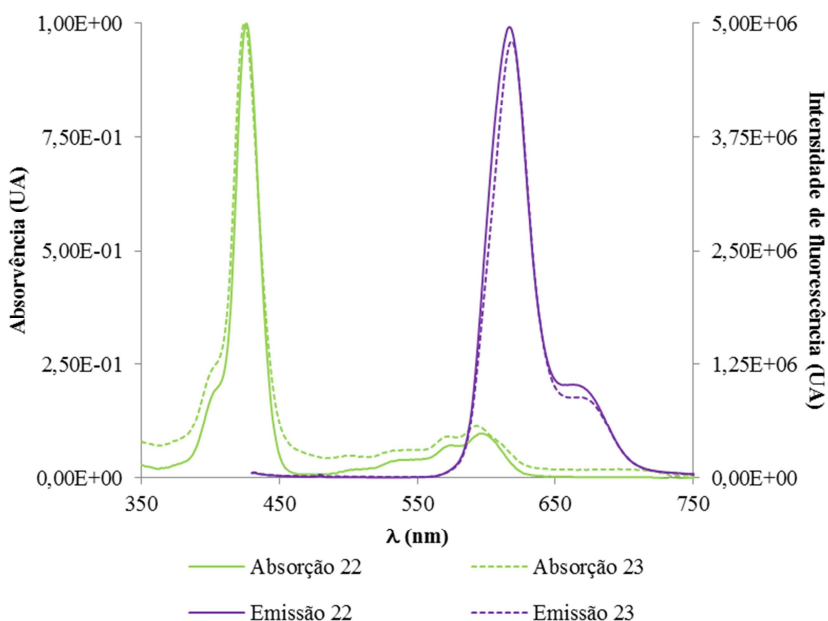


Figura 60 - Espectros de absorção e de emissão dos derivados **22** e **23** em DMSO.

Relativamente aos derivados **22** e **23**, estes apresentam máximos de emissão a 617 e a 619 nm, respectivamente.

De seguida, na Tabela 11, apresentam-se as propriedades fotofísicas estudadas dos derivados substituídos com nucleófilos aromáticos.

Tabela 11 – Propriedades fotofísicas dos derivados 18, 19, 20, 22 e 23 em DMF. Note-se que alguns valores ainda não foram determinados (ND).

Composto	λ_{fl}^* (nm)	τ_{fl} (ns) [*]			τ_T^1 (μ s)	τ_T^2 (μ s)	ϕ_{fl}	ϕ_{Δ}	Desvio de Stokes ³ (cm ⁻¹)
18	612	3,03 (18%)	0,73 (12%)	0,08 (70%)	-	1,92	0,29	0,34	6132
19	621	2,32 (71,7%)	0,07 (28,3%)	-	2,577	-	ND	ND	6833
20	624	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	7230
22	617	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	7267
23	619	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	7430

^{*}Estudos realizados em DMSO

¹Tempo de vida do estado excitado tripleto determinado por *Laser Flash Photolysis*

²Tempo de vida do estado excitado tripleto determinado por *Time-resolved singlet oxygen luminescence*

³Desvio de Stokes calculado entre o número de onda do máximo de emissão e o número de onda do máximo de absorção da banda Soret.

Observa-se que apenas os derivados **18** e **22** mantêm os comprimentos de onda dos máximos de emissão dos respectivos precursores. Os restantes compostos sofrem ligeiros desvios dos seus máximos de emissão para comprimentos de onda superiores.

No que diz respeito ao tempo de vida de fluorescência, verifica-se que os derivados **18** e **19** apresentam mais do que um estado molecular em solução. Como já foi referido, ao maior tempo de vida de fluorescência corresponde a percentagem de moléculas no estado monomérico. Assim, no caso de **18** apenas 18% das moléculas em solução se encontram na forma monomérica, existindo mais dois estados da mesma molécula com tempos de vida de fluorescência muito curtos. No caso do derivado **19**, uma percentagem significativa (71,7%) existe no estado monomérico, porém, verifica-se a presença de mais um estado molecular em solução a que corresponde um tempo de vida inferior e uma percentagem de 28,3%.

O tempo de vida do estado excitado tripleto revelou ser superior ao do corrol precursor **3** (Tabela 10) para o caso do derivado **18**; relativamente ao derivado **19** verifica-se exactamente o contrário.

No que diz respeito aos rendimentos quânticos do derivado **18** verifica-se que ocorre um decréscimo tanto no rendimento quântico de fluorescência como no rendimento quântico de geração de oxigénio singuleto, em relação ao corrol precursor **3**.

Uma possível explicação para este acontecimento será a ocorrência de fenômenos de agregação, o que está de acordo com a existência de três tempos de vida de fluorescência e com a fraca definição das bandas Q no espectro de absorção, já referida anteriormente.

Por fim, todos os derivados apresentam desvios de Stokes inferiores aos observados para os seus corróis precursores, ou seja, existe um menor intervalo energético entre a absorção e a emissão de luz.

3.3. Derivados substituídos com nucleófilos alifáticos

3.3.1. Características fotofísicas dos derivados 29, 30, 31, 32, 33 e 34

Os espectros de absorção e de emissão dos derivados do corrol **3** substituídos com álcoois (**29**, **31** e **33**) encontram-se representados na Figura 61, enquanto os espectros de absorção e de emissão dos derivados do corrol **4** substituídos com os mesmos álcoois (**30**, **32** e **34**) se apresentam na Figura 62.

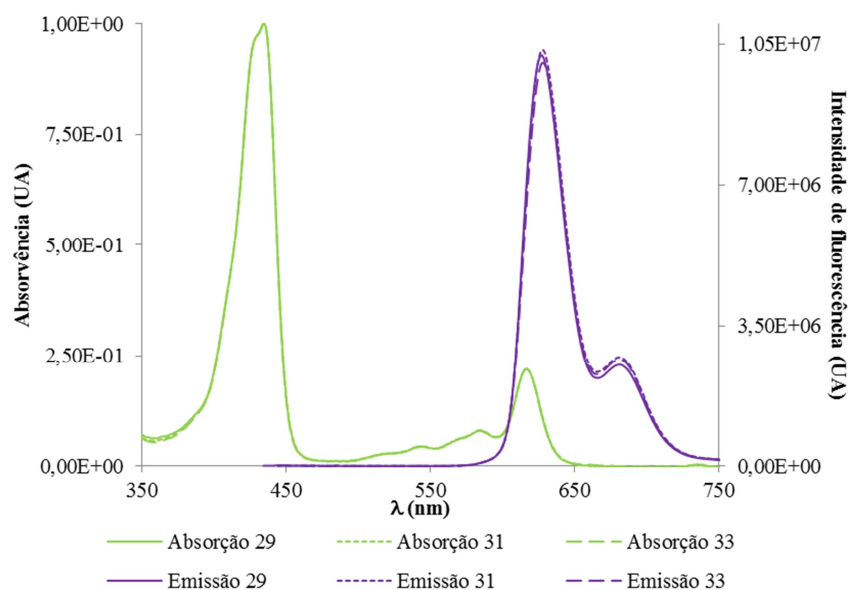


Figura 61 – Espectros de emissão e de absorção normalizados dos derivados 29, 31 e 33 em DMSO.

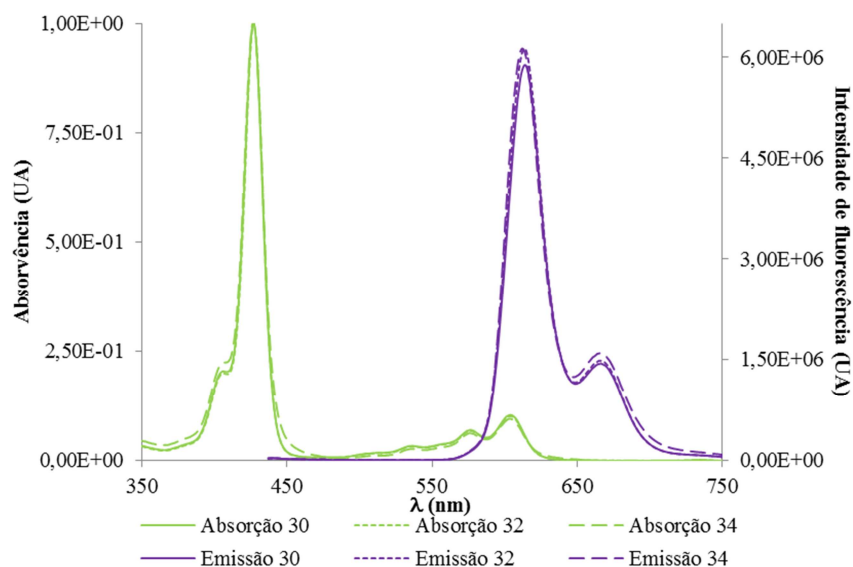


Figura 62 – Espectros de absorção e de emissão normalizados dos derivados 30, 32 e 34 em DMSO.

Como se pode verificar pela observação dos espectros, os derivados apresentam um comportamento, tanto de absorção como de emissão, igual entre si e igual ao respectivo precursor, apresentando máximos de fluorescência a 612 nm (**29**, **31** e **33**) e a 617 nm (**30**, **32** e **34**). Desta forma, os desvios de Stokes calculados são, obviamente, iguais para cada conjunto de três derivados e correspondem a 6649 cm^{-1} (inferiores ao desvio de Stokes do corrol precursor **3**) e a 7157 cm^{-1} (inferiores ao observado para o corrol precursor **4**), respectivamente - Tabela 12.

Tabela 12 – Características fotofísicas dos derivados 29, 31 e 33 e dos derivados 30, 32 e 34 em DMSO.

Composto	λ_{fl} (nm)	τ_{fl} (ns)			τ_T^1 (μ s)	τ_T^2 (μ s)	ϕ_{fl}	ϕ_{Δ}	Desvio de Stokes (cm^{-1})
29	612	3,7 (8%)	0,4 (10%)	0,04 (82%)	0,75	0,96	0,27	0,29	6649
31	612	3,82 (16%)	0,55 (11%)	0,06 (73%)	0,78	0,92	0,29	0,31	6649
33	612	3,65 (8%)	0,02 (92%)	-	0,71	0,85	0,31	0,33	6649
30	617	2,76 (68,1%)	1,33 (13,8%)	0,24 (18,1%)	1,74	-	ND	ND	7157
32	617	2,38 (64,6%)	1,65 (19,8%)	0,25 (15,6%)	1,62	-	ND	ND	7157
34	617	2,83 (60,6%)	1,18 (22,9%)	0,48 (16,5%)	1,48	-	ND	ND	7157

¹Tempo de vida do estado excitado tripleto determinado por *Laser Flash Photolysis*

²Tempo de vida do estado excitado tripleto determinado por *Time-resolved singlet oxygen luminescence*³Desvio de Stokes calculado entre o número de onda do máximo de emissão e o número de onda do máximo de absorção.

Tal como em casos anteriores, estas formas livres apresentam três tempos de vida de fluorescência (com exceção do composto **33** que apresenta apenas dois), sendo que em todos o maior tempo corresponde à menor percentagem, o que significa que o estado molecular predominante em solução não é o monomérico. Mais uma vez, pensa-se que este aspecto possa estar relacionado com a ocorrência de fenómenos de agregação, nomeadamente π - π *stacking* entre as moléculas de corrol.

Relativamente às formas complexadas, para cada derivado observa-se, novamente, a existência de três tempos de vida de fluorescência, contudo, em todos os casos, ao tempo maior corresponde a espécie em maior percentagem. Isto significa que poderão existir agregados intermoleculares em solução, no entanto, o estado molecular maioritário deverá ser o monomérico.

Considerando apenas o valor obtido para o tempo de vida do estado excitado tripleto pelo método de *Laser Flash Photolysis*, por ser o mais preciso, este diminui ligeiramente relativamente aos obtidos para os corróis precursores **3** e **4** (Tabela 10).

Os rendimentos quânticos de fluorescência (ϕ_f) e de geração de oxigénio singuleto (ϕ_Δ) são também mais baixos para os derivados substituídos do que para o corrol precursor **3**. Porém, este facto poderá não estar relacionado com a introdução destes nucleófilos no macrociclo corrólico mas sim com fenómenos de agregação.

3.3.2. Características fotofísicas dos derivados **37** e **38**

De seguida, apresentam-se os espectros de absorção e de emissão dos derivados **37** e **38** - Figura 63 e na Figura 64.

Mais uma vez, os espectros de emissão apresentam simetria relativamente aos espectros de absorção. Os máximos de fluorescência de **37** e **38** ocorrem, respectivamente, a 634 nm e a 620 nm. Desta forma, os desvios de Stokes calculados são de 7483 cm⁻¹ para o derivado **37** (superior ao do corrol precursor **3**) e de 7456 cm⁻¹ para o derivado **38** (também superior ao do corrol precursor **4**).

As restantes propriedades fotofísicas destes derivados estão ainda a ser estudadas, pelo que não serão apresentadas.

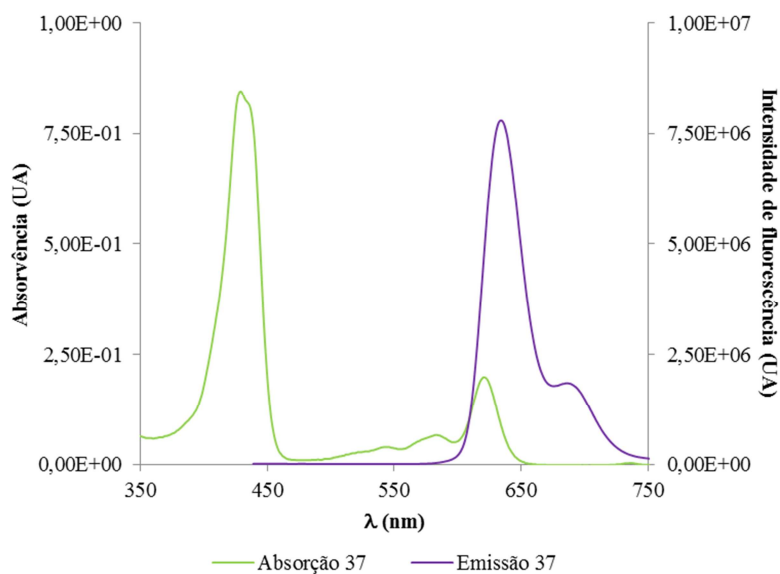


Figura 63 – Espectros de absorção e de emissão normalizado do derivado 37 em DMSO.

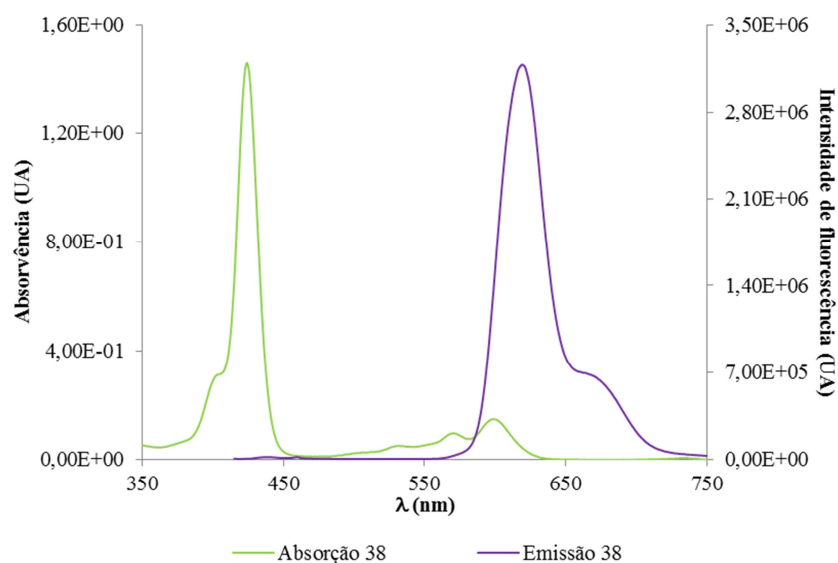


Figura 64 – Espectros de absorção e de emissão normalizados do derivado 38 em DMSO.

3.4. Conclusões

Dos estudos fotofísicos realizados pode concluir-se que a introdução de nucleófilos nos macrociclos de **3** e **4** praticamente não interfere com as suas propriedades de absorção e de emissão de luz. Porém, nos casos já estudados observa-se uma diminuição dos rendimentos quânticos de fluorescência e de geração de oxigénio singuleto. No entanto, sugere-se que, tendo em conta os tempos de vida de fluorescência

determinados, esta diminuição esteja relacionada com fenómenos de agregação e não com a alteração das estruturas dos corróis precursores. Verificou-se ainda que o tempo de vida do estado excitado tripleto nalguns casos é superior e noutros é inferior ao dos corróis precursores.

Note-se que alguns dos derivados ainda estão a ser estudados, pelo que os seus parâmetros fotofísicos não foram apresentados.

Por fim, poderá dizer-se que os derivados do corrol **4** apresentam características fotofísicas mais promissoras do que os derivados do corrol **3**, nomeadamente pela introdução do ião metálico gálio(III) no interior do macrociclo diminuir os fenómenos de agregação.

Por outro lado, espera-se que os derivados do corrol **4** venham a ser melhores geradores de oxigénio singuleto devido ao efeito do átomo pesado. O efeito do átomo pesado traduz-se pelo aumento da taxa a que ocorre um processo de transição proibido, como é o caso do cruzamento inter-sistemas, que permite que uma molécula no estado excitado singuleto passe para o estado excitado tripleto, devido à presença de um átomo de número atómico elevado.^[92] No estado excitado tripleto a molécula pode reagir com o oxigénio molecular, gerando oxigénio singuleto por transferência de energia.

4. Estudos biológicos

A monitorização dos processos de foto-inactivação bacteriana requer procedimentos rápidos e simples. Desta forma, é essencial que se desenvolvam novos métodos de estudo *in vitro* de potenciais fotossensibilizadores, visando acelerar o desenvolvimento da aPDT. É neste contexto que surge o método de monitorização que utiliza bactérias bioluminescentes, considerado um método rápido, sensível e de baixo custo de operação. Por outro lado, apenas detecta células vivas e viáveis e não requer a administração de substratos exógenos para que se verifique a emissão de luz.

No processo de bioluminescência a produção de luz depende directamente da actividade metabólica do organismo, logo, a diminuição da actividade celular resulta numa diminuição da taxa de bioluminescência.^[93]

Entre as espécies emissoras de luz existem bactérias, dinoflagelados, peixes, fungos, insectos, lulas e camarões. As mais abundantes e difundidas são as bactérias, sendo encontradas em diversos ambientes. A emissão de luz por bactérias simbióticas, que vivem em associação com organismos superiores, terá como função a comunicação, a atracção de presas ou a fuga aos predadores, entre outras.^[94]

Em termos bioquímicos, a reacção de emissão de luz é catalisada por enzimas designadas como luciferases. Esta reacção diverge consoante o organismo, sendo comum a todos a presença do oxigénio molecular. No caso das bactérias ocorre a oxidação do fosfato de riboflavina reduzido (FMNH₂) e de um aldeído de cadeia longa, respectivamente, a fosfato de riboflavina (FMN) e ao correspondente ácido gordo, sendo emitida uma luz azul-esverdeada:^[95]



Note-se que em sistemas experimentais pode demonstrar-se a existência de uma forte correlação entre a bioluminescência observada e a quantidade de bactérias viáveis. Deste modo, como já foi referido, a medição da bioluminescência oferece um método alternativo e rápido para controlar a viabilidade bacteriana. Sabe-se que a emissão de luz é não cumulativa, pelo que, reflecte a taxa metabólica em determinado instante, podendo ser medida directa e continuamente e de forma não destrutiva. Assim, para além de ser rápido e sensível, este método acarreta custos muito reduzidos, o que significa uma grande vantagem, e constitui uma metodologia simples para avaliar, em

tempo real, a eficiência de determinado fotossensibilizador na foto-inativação bacteriana.^[96]

Dos vários factores que influenciam o efeito fotodinâmico em bactérias os três principais são a célula bacteriana, o fotossensibilizador e a fonte de luz.

De facto, o efeito fotodinâmico será diferente consoante a bactéria seja Gram-positiva ou Gram-negativa, como já foi referido. Para além disso, o estado fisiológico em que a célula se encontra tem influência, na medida em que as células na fase logarítmica de crescimento são bastante mais susceptíveis à foto-inativação do que as células na fase estacionária. É ainda relevante a densidade celular, uma vez que as células competem entre si não só para interagirem com o fotossensibilizador, mas também para reagirem com as espécies citotóxicas que são geradas pelo processo fotodinâmico.^[97]

Em relação ao fotossensibilizador, os vários factores passíveis de influenciar a sua eficiência fotodinâmica são as características estruturais, nomeadamente, a presença ou não de carga, a presença e natureza de substituintes, o estado de ionização e a concentração utilizada.

Por último, a fonte de luz terá também influência, visto que o efeito fotodinâmico depende de factores como a sua potência, o comprimento de onda utilizado e o tempo de irradiação.^[98]

4.1. Ensaios com a bactéria bioluminescente *Vibrio Fischeri*

Atendendo a que ainda não estavam concluídos os estudos fotofísicos de todos os novos derivados, avançámos para os estudos biológicos com os dois derivados catiónicos preparados, **20** e **23**, por serem aqueles que nos pareceram mais apropriados para esta aplicação.

No estudo preliminar realizado para monitorizar a foto-inativação com os dois derivados catiónicos sintetizados, **20** e **23**, e os respectivos precursores neutros, **19** e **22**, - Figura 65 - utilizou-se a bactéria bioluminescente *Vibrio Fischeri* ATCC 49387.

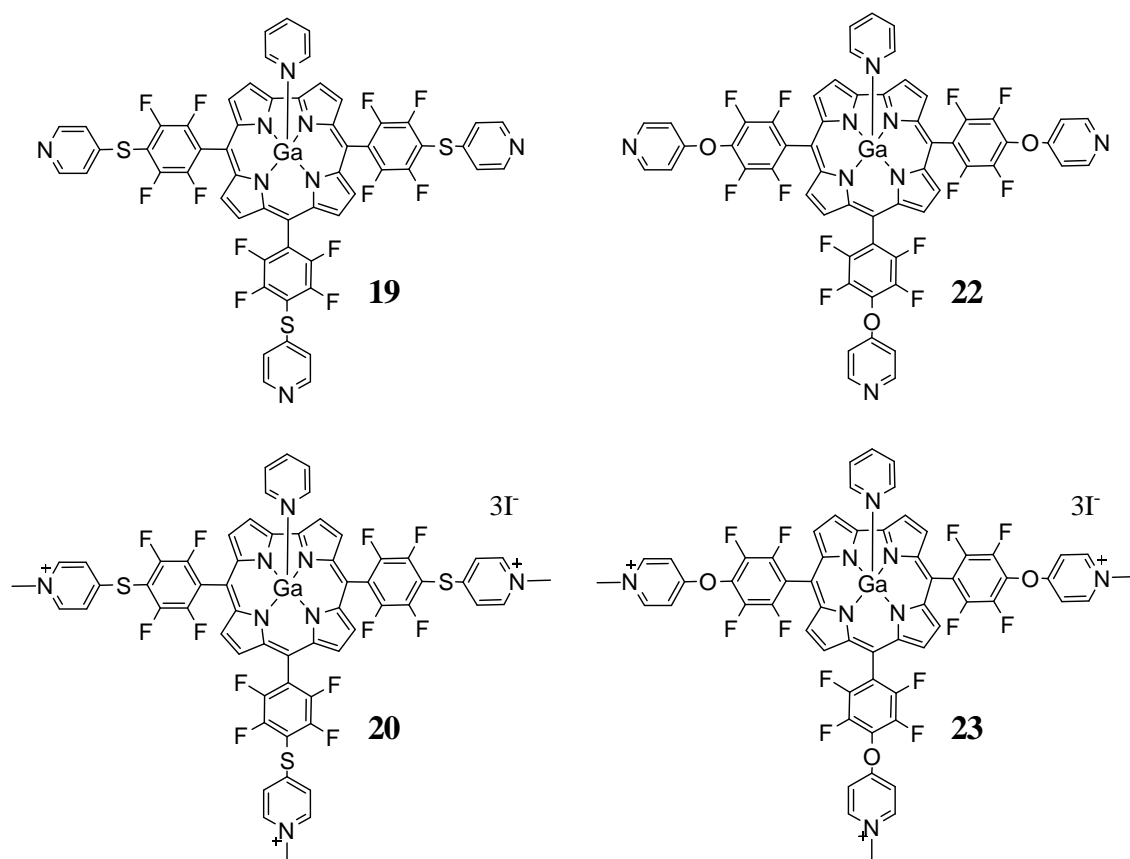


Figura 65 – Estruturas dos derivados 19, 20, 22 e 23, utilizados nos estudos biológicos.

A *V. fischeri* bioluminescente é uma bactéria Gram-negativa marinha que vive, predominantemente, numa relação simbiótica com outros organismos marinhos.

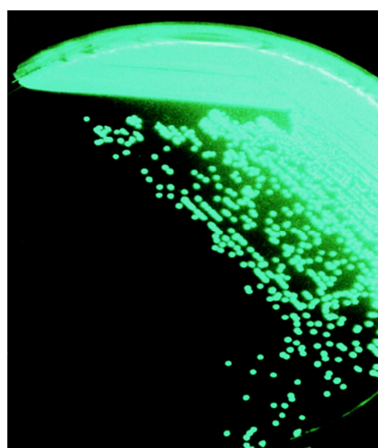


Figura 66 – Cultura de *V. fischeri* fotografada no escuro. (Fotografia de capa de *J. Bacteriol.*, 184, (16), 2002; retirada de <http://jb.asm.org/content/vol184/issue16/cover.dtl>)

O operão (unidade funcional do genoma) *luxCDABE*, constituído por cinco genes, é o responsável pela codificação da enzima luciferase e das enzimas que controlam a biossíntese do aldeído de cadeia longa que actua como substrato. Apesar de

terem sido identificados mais genes *lux* em bactérias luminescentes naturais, apenas a operação *luxCDABE* é indispensável à emissão de luz.^[98]

O procedimento utilizado para a monitorização da foto-inativação de *V. fischeri* consistiu na irradiação (com luz branca e uma potência $100 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$) de cuvetes contendo uma suspensão bacteriana e fotossensibilizador a uma determinada concentração, consoante o ensaio. A bioluminescência foi lida directamente da cuvette, (ou por diluição da suspensão nela contida, nalguns casos) num luminómetro, em intervalos de tempo estabelecidos. O *setup* utilizado apresenta-se na Figura 67; durante os ensaios as cuvetes são mantidas sob agitação e num banho de água para evitar uma alteração significativa de temperatura.

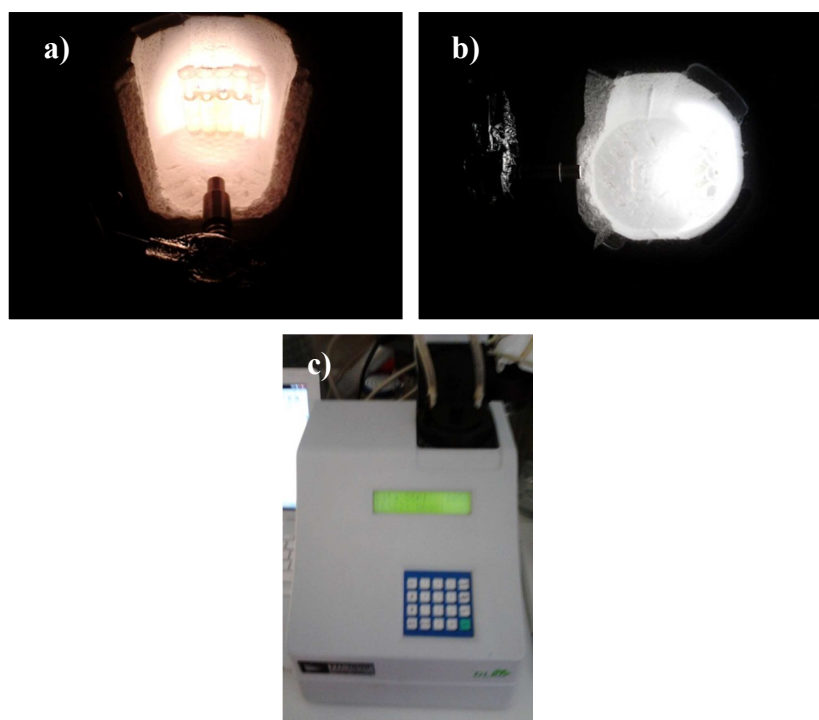


Figura 67 – *Setup* utilizado nos estudos de foto-inativação de *V. fischeri*. a) Vista de frente do *setup*; b) Vista superior do *setup*; c) Luminómetro.

4.2. Estudos de foto-inativação de *V. fischeri*

Os estudos de foto-inativação de *V. fischeri* foram realizados à temperatura ambiente e em todos os ensaios foram realizados controlos claros e controlos escuros. O controlo claro consistiu numa cuvette onde existia apenas a amostra da cultura bacteriana em PBS (solução-tampão de fosfato) e sem FS. O controlo claro tem como função avaliar se as células estão, efectivamente, a ser foto-inactivadas ou se estão a perder a

viabilidade por circunstâncias alheias. Os controlos escuros de cada fotossensibilizador, ou seja, cuvetes com a amostra de cultura bacteriana em PBS e o FS que foram protegidas da luz com papel de alumínio durante todo o ensaio, permitem assegurar que o FS não é tóxico na ausência de luz, nem afecta a viabilidade celular.

Note-se que cada ensaio foi repetido três vezes e os resultados apresentados constituem uma média das três réplicas realizadas.

Utilizou-se como referência, nestes estudos, a 5,10,15,20-tetraquis(4-piridil)porfirina neutra **41** e o correspondente derivado catiónico **42** - Figura 68. A porfirina **42** é uma porfirina já estudada como FS e que demonstrou ser bastante eficiente na foto-inactivação de bactérias Gram-negativas.^[99]

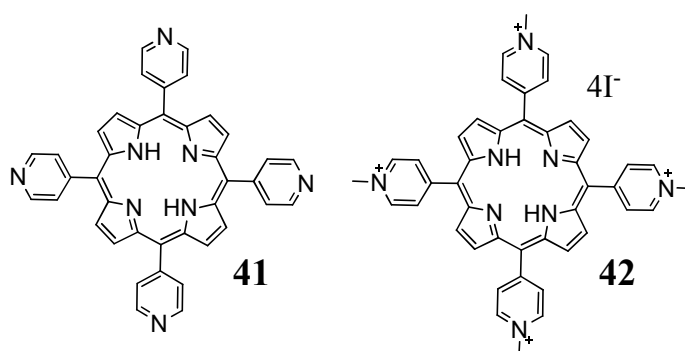


Figura 68 – Estrutura da 5,10,15,20-tetraquis(4-piridil)porfirina **41** e da tetra-iodeto de 5,10,15,20-tetraquis-(1-metilpiridínio-4-il)porfirina **42**.

Todas as soluções *stock* em DMSO foram sujeitas a sonicação durante 30 minutos antes do início do ensaio e da sua adição à suspensão bacteriana.

4.2.1. Derivados catiónicos **20** e **23**

O estudo de foto-inactivação de *V. fischeri* com corróis iniciou-se com ensaios preliminares em que se utilizaram os potenciais fotossensibilizadores **20** e **23** com uma concentração de 10 µM.

Em todos os ensaios realizados, quer os controlos claros, quer os controlos escuros apresentaram um comportamento relativamente estável, ou seja, não se registou um decréscimo de bioluminescência significativo ao longo dos ensaios, o que significa que as bactérias mantiveram a viabilidade na ausência de fotossensibilizador e que os derivados testados como fotossensibilizadores não são tóxicos na ausência de luz.

Na Figura 69 apresentam-se os resultados dos ensaios realizados com 10 µM dos derivados **20** e **23**.

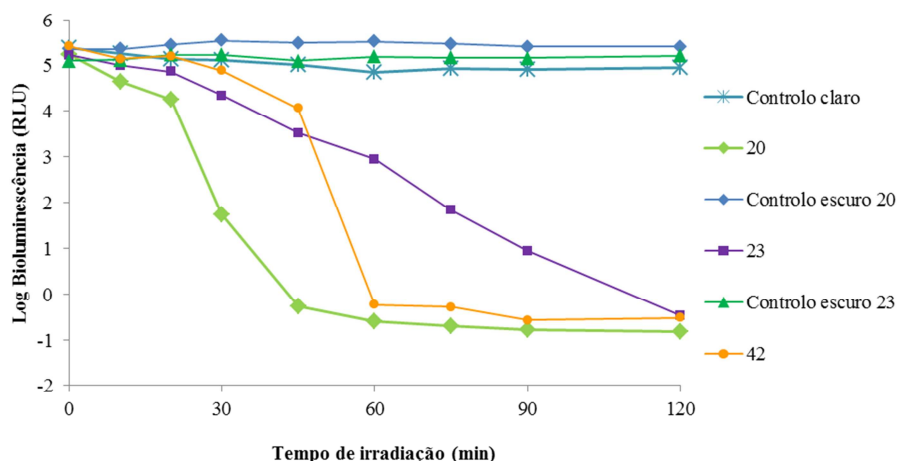


Figura 69 - Foto-inativação de *V. fischeri* bioluminescente com luz branca e uma potência de 100 mW·cm⁻² com os fotossensibilizadores 20, 23 e 42 na concentração de 10 µM (média de três ensaios).

Como se pode observar, verifica-se que com esta concentração os dois derivados, **20** e **23**, promovem a foto-inativação total da bactéria, porém, com cinéticas diferentes. Enquanto o derivado **20** inativa totalmente ao fim 45 minutos, sendo mais eficiente até que a porfirimina **42** (que atinge a inativação total ao fim de 60 minutos), o derivado **23** necessita de 120 minutos para atingir este resultado.

Os resultados obtidos levaram-nos a diminuir significativamente a concentração dos fotossensibilizadores utilizados, com o intuito de verificar se a sua eficiência era mantida a concentrações mais baixas. Assim, os ensaios foram repetidos na concentração de 2 µM e estes resultados apresentam-se na Figura 70. Nestas condições observa-se que o derivado **20** continua a demonstrar uma boa eficiência, embora necessite de mais tempo para atingir o limite de detecção. De facto, a inativação total é obtida ao fim de 60 minutos, apresentando uma cinética e eficiência semelhantes às do derivado **42**.

Apesar de o derivado **23** com a concentração de 2 µM ser capaz de inativar a bactéria Gram negativa *V. fischeri*, fá-lo reduzindo apenas, aproximadamente, 2 unidades logarítmicas de bioluminescência, ao fim de 120 minutos.

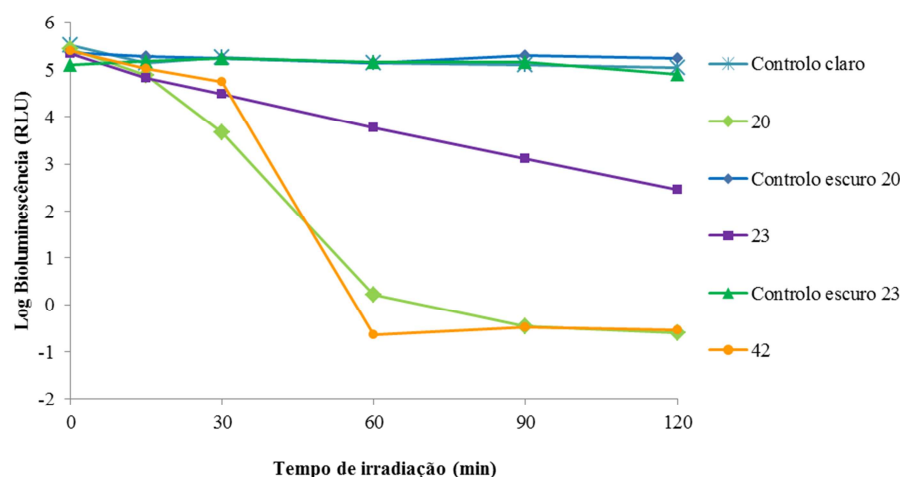


Figura 70 – Foto-inativação de *V. fischeri* bioluminescente com luz branca e uma potência de 100 mW·cm⁻² com os fotossensibilizadores 20, 23 e 42 na concentração de 2 μM (média de três ensaios).

Tendo em conta os resultados promissores obtidos com o derivado **20**, foi testada a sua eficiência a uma concentração ainda mais baixa (1 μM) e os resultados obtidos apresentam-se na Figura 71.

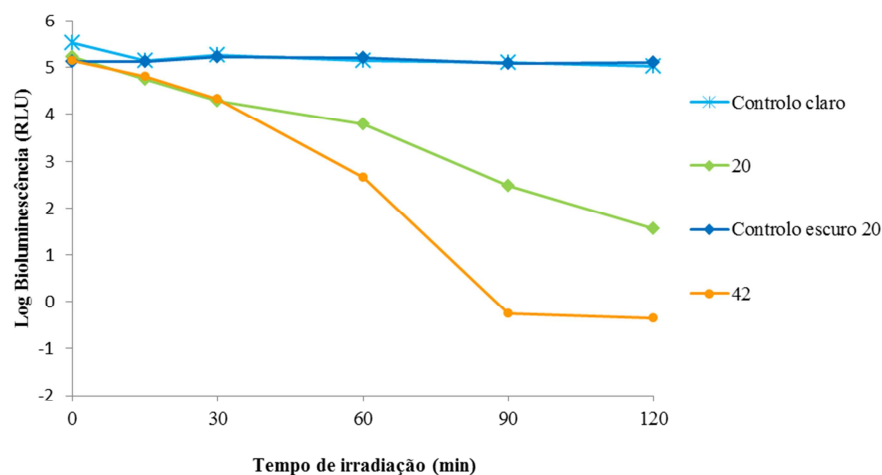


Figura 71 - Foto-inativação de *V. fischeri* bioluminescente com luz branca e uma potência de 100 mW·cm⁻² com os fotossensibilizadores 20 e 42 na concentração de 1 μM (média de três ensaios).

Quando os fotossensibilizadores são utilizados a uma concentração de 1 μM observa-se uma diminuição da eficiência, tanto do derivado **20** como da porfirina **42**, utilizada como referência (já que esta apenas atinge a inativação total ao fim de 90 minutos). O derivado **20** não tem capacidade para inactivar totalmente as células

bacterianas no intervalo de 120 minutos, registando-se apenas um decréscimo de cerca de 3 log na bioluminescência.

Uma vez que o derivado **23**, se revelou menos eficiente a 2 μM relativamente ao derivado **20**, testou-se a foto-inactivação com este FS a uma concentração de 20 μM , de modo a avaliar se existiria um aumento na sua eficiência - Figura 72.

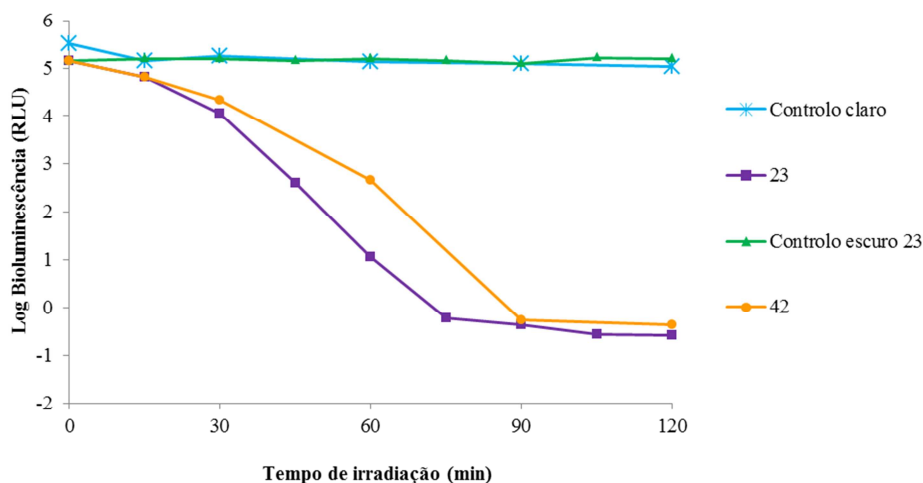


Figura 72 - Foto-inativação de *V. fischeri* bioluminescente com luz branca e uma potência de 100 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ com os fotossensibilizadores 23 e 42 na concentração de 20 μM (média de três ensaios).

De facto, pode verificar-se que a esta concentração o derivado **23** é capaz de inactivar totalmente a *V. fischeri* ao fim de 75 minutos, uma antecipação de 45 minutos relativamente ao ensaio realizado com a concentração de 10 μM . Por outro lado, o derivado porfirínico **42** parece perder eficiência relativamente à concentração de 10 μM (na medida em que aos 60 minutos ainda não atingiu o limite de detecção do método), o que poderá estar relacionado com fenómenos de agregação intermolecular.

Em todos os casos a foto-inativação total foi comprovada através do cultivo em placa de 15 μL da suspensão bacteriana no final do ensaio. Após um período de crescimento de 24 horas não se observou o crescimento de qualquer unidade formadora de colónia (UFC), o que corroborou a eficiência destes derivados como fotossensibilizadores. Por outro lado, através do mesmo procedimento, nos casos em que não se verificou um decréscimo acentuado da bioluminescência durante os ensaios, observou-se o crescimento de um número incontável de UFC's.

4.2.2. Derivados neutros 19 e 22

Tendo em consideração os resultados obtidos nos ensaios com os derivados catiónicos, decidiu-se testar os derivados neutros com a concentração de 10 μM - Figura 73. É de realçar que é aceite que as bactérias Gram negativas são menos susceptíveis à foto-inactivação com FS neutros ou aniónicos.

O controlo claro e os controlos escuros realizados revelaram manter-se relativamente estáveis durante o ensaio, o que significa que as células não estão a perder viabilidade na ausência do fotossensibilizador e que os compostos **19** e **22** testados não são tóxicos na ausência de luz.

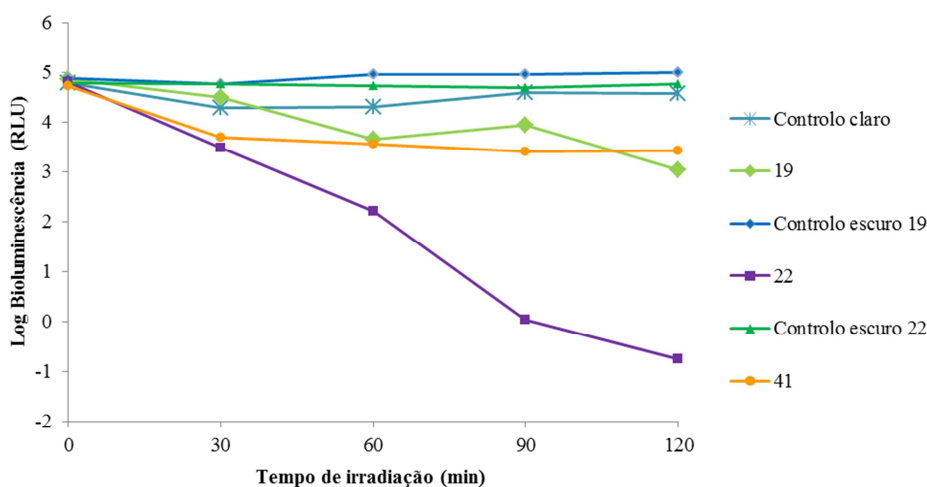


Figura 73 - Foto-inactivação de *V. fischeri* bioluminescente com luz branca e uma potência de 100 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ com os fotossensibilizadores 19, 22 e 41 na concentração de 10 μM (média de três ensaios).

Os resultados de foto-inactivação com os derivados neutros revelaram-se surpreendentes. A carga positiva na estrutura molecular é considerada um aspecto fulcral para a inactivação de bactérias Gram-negativas, no entanto, verificou-se que o derivado neutro **22** promove a inactivação total da bactéria ao fim de 90 minutos. Tal como nos casos anteriores, os resultados foram confirmados por plaqueamento (cultivo em placa) de 15 μL das suspensões bacterianas no final do ensaio. As culturas foram deixadas a crescer durante 24 horas e no dia seguinte todas as placas apresentavam colónias de bactérias, com excepção daquela onde se cultivou a suspensão bacteriana foto-inactivada com o derivado **22** onde não se verificou o crescimento de qualquer colónia. Os restantes derivados, incluindo a porfirina **41** mostraram-se ineficientes na inactivação de *V. fischeri* nestas condições.

Uma possível justificação para este facto pode estar relacionada com o pH da solução (pH 7,4) e com uma maior basicidade do derivado **22** quando comparado com o **19** ou mesmo com o **41**. Assim, é possível que a pH=7,4 os grupos piridilo se encontrem protonados, gerando-se uma espécie catiónica necessária para a interacção com camada externa das bactérias, seguindo-se a foto-inactivação destas células.

4.3. Estudos de foto-estabilidade

Considerando os resultados dos ensaios biológicos, decidiu-se proceder a um estudo de estabilidade e de foto-estabilidade dos derivados testados na inativação de *V.fischeri*, incluindo o derivado **42**, utilizado como referência.

Deste modo, realizaram-se ensaios com 10 μM de FS em PBS (solução preparada a partir de uma solução de 500 μM de FS em DMSO) e ensaios com os compostos dissolvidos apenas em DMSO. Nos ensaios de foto-estabilidade as cuvets com as respectivas soluções foram mantidas sob agitação e irradiadas com luz branca e uma potência de $100 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ durante 120 minutos. O seu espectro de absorção foi medido em intervalos de tempo determinados.

Nos ensaios de estabilidade as cuvets com os derivados foram apenas mantidas sob agitação, na ausência de luz, durante os 120 minutos e os seus espectros de absorção foram igualmente medidos em intervalos de tempo determinados.

De seguida apresentam-se os espectros obtidos ao longo dos ensaios - Figura 74, Figura 75, Figura 76, Figura 77 e Figura 78.

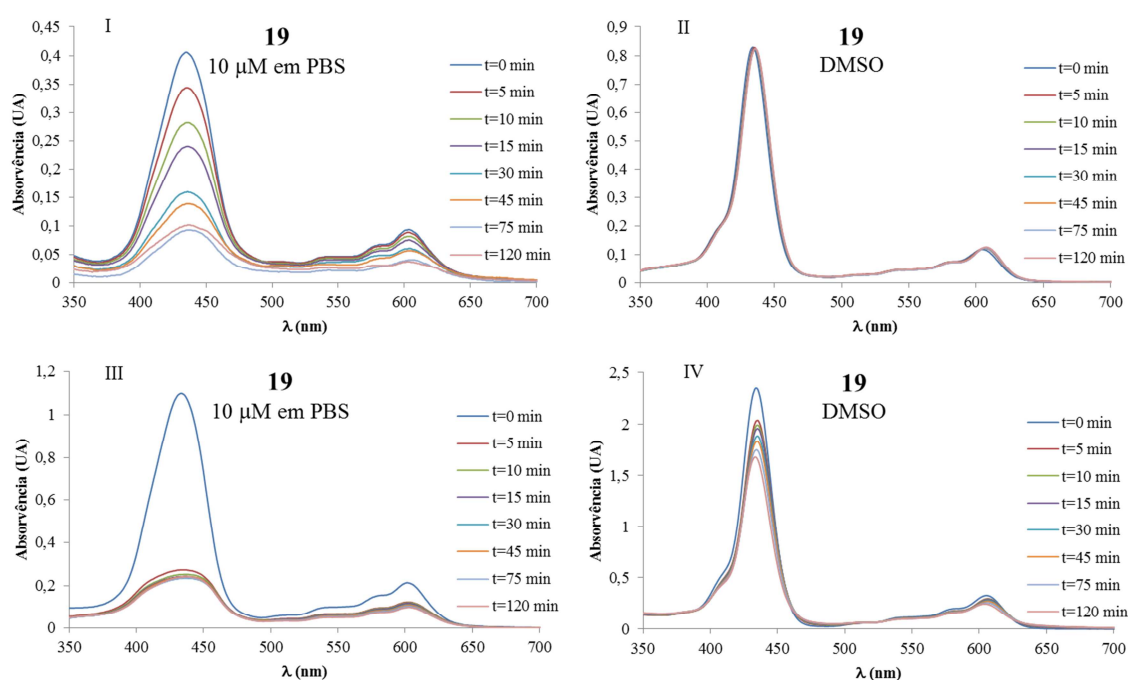


Figura 74 - Variação da absorvência com o tempo na ausência (I e II) e presença (III e IV) de luz do derivado 19 em DMSO e em PBS.

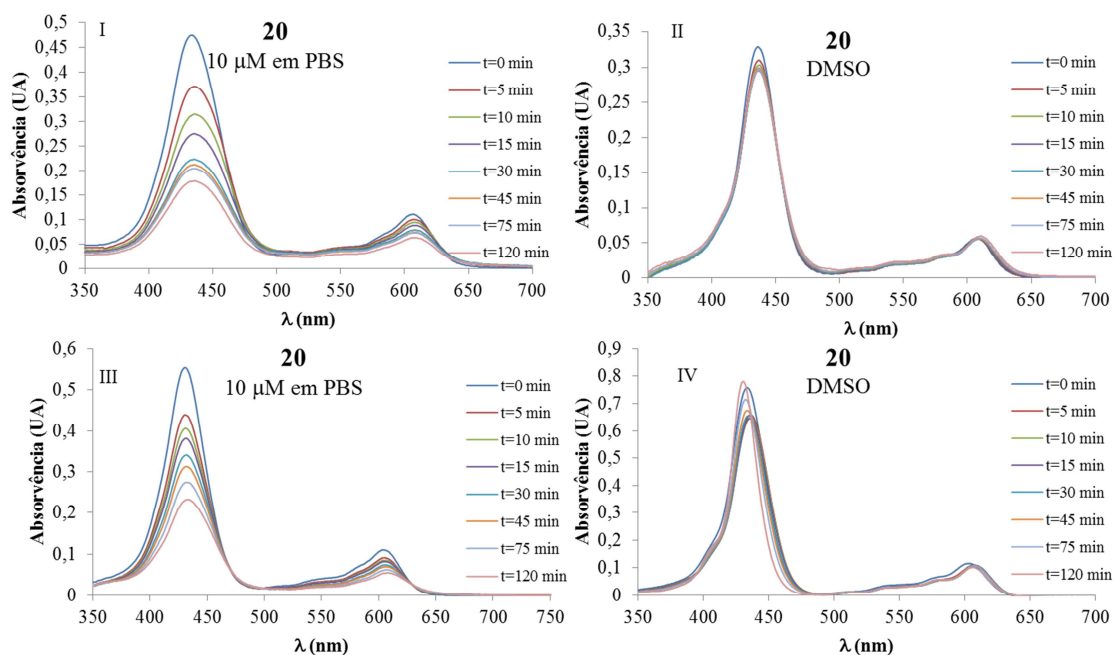


Figura 75 - Variação da absorvência com o tempo na ausência (I e II) e presença (III e IV) de luz do derivado 20 em DMSO e em PBS.

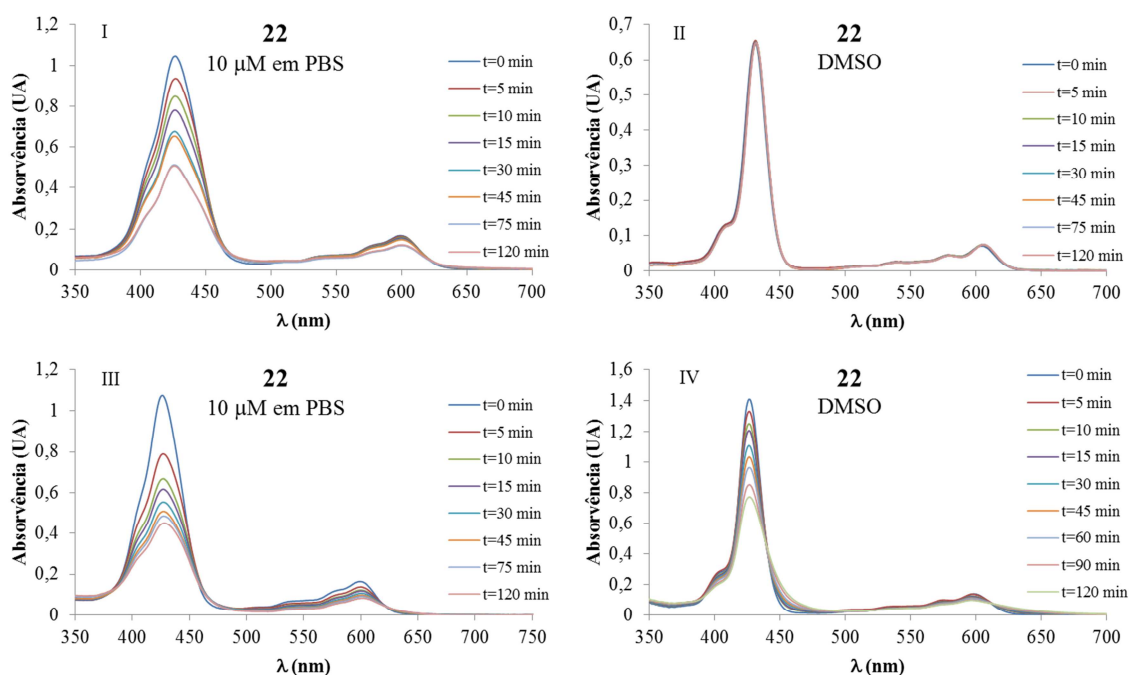


Figura 76 – Variação da absorvência com o tempo na ausência (I e II) e presença (III e IV) de luz do derivado 22 em DMSO e em PBS.

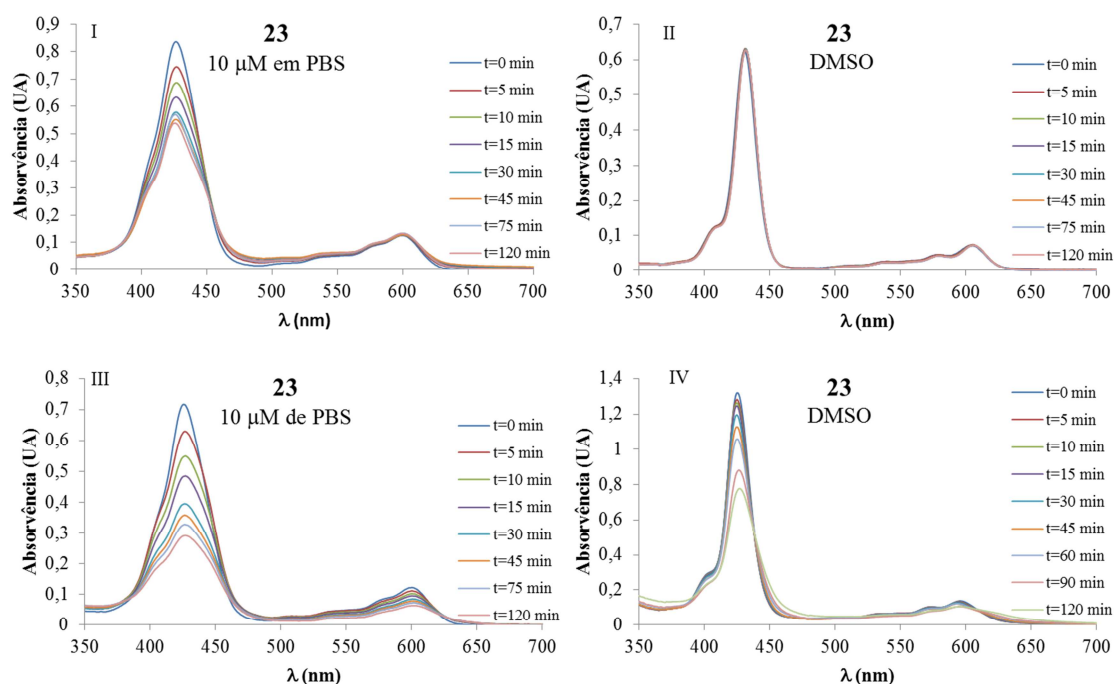


Figura 77 - Variação da absorvência com o tempo na ausência (I e II) e presença (III e IV) de luz do derivado 23 em DMSO e em PBS.

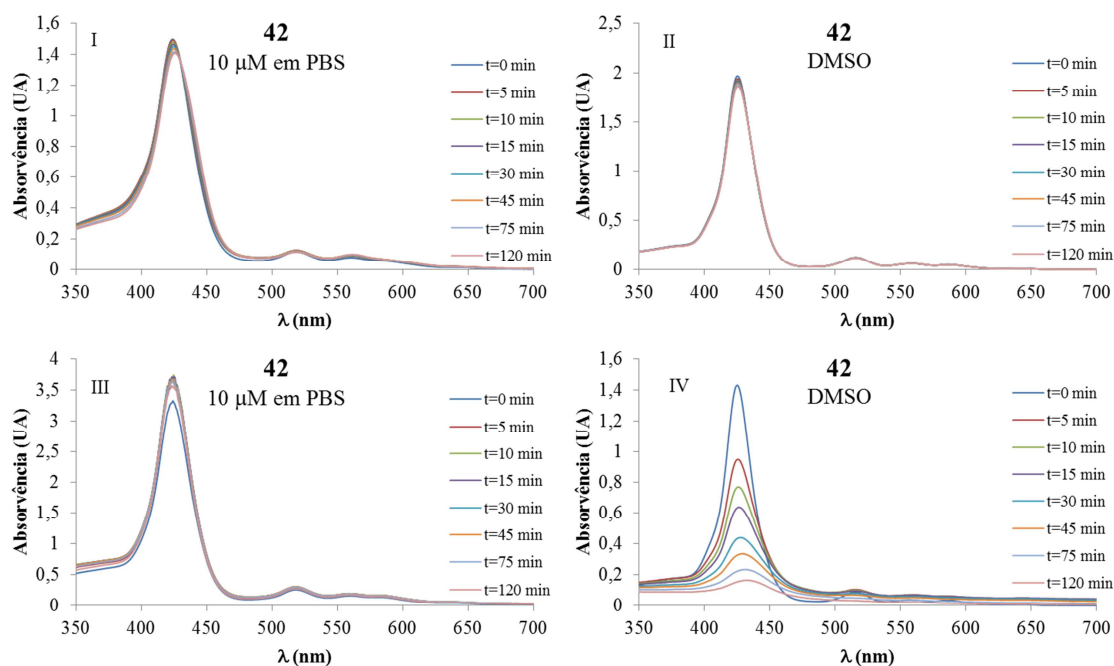


Figura 78 - Variação da absorvência com o tempo na ausência (I e II) e presença (III e IV) de luz do derivado 42 em DMSO e em PBS.

Da análise dos espectros pode inferir-se que todos os derivados são estáveis em DMSO na ausência de luz. Porém, na presença de luz, observam-se variações de intensidade nos máximos de absorvência que não são tão significativas no caso de **19** e

20 mas ganham notoriedade nos restantes derivados. Atendendo a que não há desvios do comprimento de onda dos máximos de absorção, sugere-se a formação de agregados intermoleculares, em detrimento da ocorrência de decomposição dos derivados.

Por outro lado, quando o ensaio é realizado com 10 μ M em PBS, com e sem irradiação, com excepção do derivado **42**, observa-se em todos os derivados uma diminuição da intensidade de absorção nos respectivos máximos ao longo do tempo.

Note-se que o derivado **42** apresenta quatro cargas positivas, contrariamente aos derivados corrólicos, que apresentam apenas três, pelo que, será mais hidrossolúvel num meio aquoso do que os restantes derivados. Desta forma, sugere-se que quando os derivados são colocados em PBS, ainda que dissolvidos primeiramente em DMSO, formem agregados intermoleculares, daí que as intensidades nos máximos de absorção diminuam mesmo no escuro. Este efeito será ainda mais perceptível no caso dos derivados neutros **19** e **22**. Aliás, no caso do derivado **19**, quando este é colocado em PBS observa-se claramente a formação de agregados e a precipitação dos mesmos. Apesar da agregação intermolecular ser um dos factores que diminui o rendimento quântico de geração de oxigénio singuleto, alguns dos derivados estudados apresentaram eficiência fotodinâmica na inactivação de *V. fischeri*, pelo que o oxigénio singuleto gerado é suficiente para inactivar a comunidade bacteriana.

4.4. Conclusões

Os ensaios biológicos preliminares de foto-inactivação de *V. fischeri* usando os novos derivados sintetizados como fotossensibilizadores permitiu-nos inferir acerca da sua potencialidade para aplicação em aPDT.

Assim, na Figura 79 observa-se um resumo gráfico das condições em que se observou foto-inactivação total da bactéria com os derivados **20** e **23**, tomando como referência a porfirina **42**.

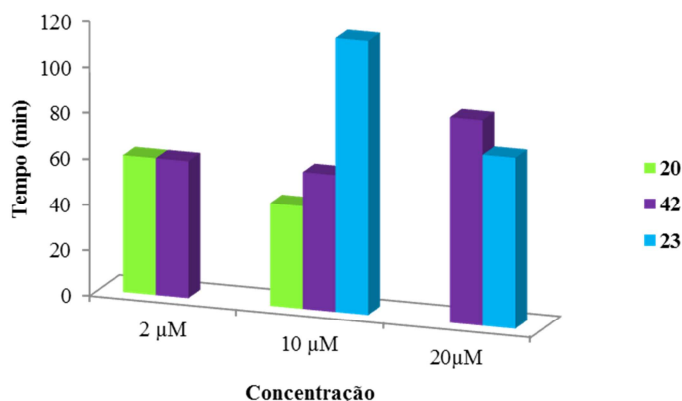


Figura 79 – Comparação dos tempos para a foto-inativação total de *V. fischeri* na presença dos derivados catiónicos **20** e **23**, utilizando como referência a porfirina **42**, quando irradiados com luz branca e a uma potência de $100 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$.

Da análise destes resultados pode concluir-se que o derivado **20** numa concentração de $2 \mu\text{M}$ apresenta uma eficiência igual à da porfirina **42**. Porém, um aumento da concentração para $10 \mu\text{M}$ leva a um aumento da sua eficiência, atingindo mais rapidamente a foto-inativação total da bactéria do que o derivado **42** nas mesmas condições. Neste caso, ao fim de 45 minutos já não existem bactérias viáveis em suspensão.

Relativamente ao derivado **23**, este apresenta uma menor eficiência do que a porfirina **42** numa concentração de $10 \mu\text{M}$. Contudo, utilizando $20 \mu\text{M}$ deste fotossensibilizador consegue-se melhorar a sua eficiência e a inativação total é atingida ao fim de 75 minutos. Deste modo, verifica-se que o corrol **23** é mais eficiente do que o composto **42** nestas condições.

Destes estudos preliminares pode concluir-se que os dois derivados catiónicos, **20** e **23**, são eficientes na foto-inativação da bactéria Gram-negativa *V. fischeri*, sendo, nalguns casos, a sua eficiência superior à do derivado porfirínico **42**.

A grande surpresa nestes ensaios foi inativação total de *V. fischeri* atingida ao fim de 90 minutos com a utilização do derivado neutro **22** com a concentração de $10 \mu\text{M}$, um comportamento não observado em nenhum dos restantes derivados neutros testados.

Por fim, conclui-se que apesar de os derivados parecerem ser afectados por fenómenos de agregação em PBS, apresentam eficiência fotodinâmica nos casos já referidos, tendo sido a primeira vez que se estudaram coróis como FS na inativação bacteriana.

5. Parte experimental

5.1. Reagentes, solventes e equipamentos

Os reagentes comerciais, de diversas marcas, foram utilizados sem qualquer purificação prévia, uma vez que o seu grau de pureza assim permitiu, com excepção do pirrol que foi previamente destilado.

Nos processos de purificação e cristalização foram utilizados solventes analiticamente puros.

Na maioria dos casos, o diclorometano e clorofórmio destilados utilizados foram previamente passados por uma coluna de alumina neutra.

O tolueno e o tetra-hidrofurano encontravam-se acondicionados em fio de sódio.

O dimetilsulfóxido, a dimetilformamida e a *N,N*-dimetiletanolamina foram secos por acondicionamento com peneiros moleculares.

A piridina foi seca por aquecimento a refluxo sobre hidróxido de sódio e destilada em seguida.

A monitorização das reacções foi realizada através de cromatografia em camada fina (TLC), utilizando folhas plastificadas revestidas com sílica gel 60 (Merck) de espessura 0,2 mm.

As purificações por cromatografia em camada fina preparativa foram realizadas em placas de vidro (20x20 cm) previamente revestidas com uma camada de sílica gel 60 (Merck) com, aproximadamente, 0,5 mm de espessura e activadas numa estufa a 100°C durante 6 a 8 horas.

Nas separações e purificações realizadas por cromatografia em coluna utilizaram-se colunas de vidro preenchidas com sílica gel 60 (Merck) de granulometria 32-63 ou 63-200 mesh.

Os espectros de RMN de ^1H e ^{19}F foram registados num aparelho Bruker Avance 300, operando a 300,13 e 282,38 MHz, respectivamente. O tetrametilsilano ($\delta=0$ ppm) foi utilizado como padrão interno no caso do RMN de ^1H . Nos espectros de RMN de ^{19}F utilizou-se o C_6F_6 como referência, considerando o respectivo sinal a $\delta=-163$ ppm, tendo como referência primária o CFCl_3 ($\delta=0$ ppm). Na maioria dos casos, os desvios químicos (δ , ppm) apresentados para cada composto foram obtidos em solução de clorofórmio deuterado, CDCl_3 . Noutros casos, nomeadamente no caso dos compostos catiónicos, estes foram determinados em solução de metanol deuterado, CD_3OD . Aos

derivados complexados com gálio(III), adicionou-se uma gota de piridina deuterada às soluções preparadas para análise por RMN.

Nalguns casos utilizaram-se também as técnicas de RMN bidimensionais mononucleares de COSY e NOESY.

Os espectros de ultravioleta-visível foram registados em soluções de DMSO no espectrofotómetro UV-2501-PC Shimadzu, utilizando células de quartzo de 1 cm de percurso óptico.

Os espectros de fluorescência foram adquiridos em soluções de DMSO num espectrofotómetro Fluoromax-3, utilizando células de quartzo de 1 cm de percurso óptico e com as quatro faces polidas.

Os tempos de vida de fluorescência, tempos de vida do estado excitado tripleto do fotossensibilizador e luminescência do oxigénio singuleto foram determinados pelo grupo da Prof. Beate Röder no Instituto de Física da Universidade Humboldt de Berlim.

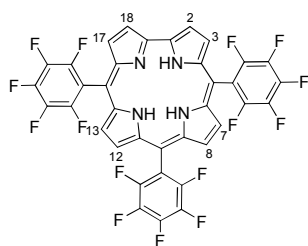
Os espectros de massa de MALDI-MS foram adquiridos no espectrómetro de MALDI/TOF/TOF 4800 Applied Biosystems MDS Sciex, usando como solvente CH_2Cl_2 ou CH_3OH , com ou sem matriz.

Os espectros de massa de alta resolução em ESI^+ foram adquiridos no espectrómetro VG Autospec M, no serviço de amostras da Universidade de Vigo, Espanha.

5.2. Síntese de 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrol 3

A síntese deste composto foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Gryko *et al.*^[48]

Num balão em forma de pêra adicionaram-se 0,22 mL (2 mmol) de pentafluorobenzaldeído, 20 μL (24 μmol) de uma solução de TFA 10% em diclorometano e 0,21 mL (3 mmol) de pirrol. A mistura foi deixada sob agitação à temperatura ambiente durante 10 minutos, findos os quais se adicionaram 20,0 mL de diclorometano. O balão reaccional foi mergulhado parcialmente num banho de ultra-sons, ao que se seguiu a adição de uma solução de 546 mg (2,4 mmol) de DDQ em 4,0 mL de tolueno:THF (1:1) e mantida a agitação durante 5 minutos. A mistura foi vertida no topo de uma coluna cromatográfica contendo sílica gel para TLC preparativa e eluída com uma mistura diclorometano:éter de petróleo (1:4). A fracção roxa recolhida com este eluente corresponde ao composto pretendido. O solvente foi evaporado e o PFC foi cristalizado a baixa temperatura (-20°C) numa mistura de diclorometano e hexano.



RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300,13 MHz): δ 9,12 (d, 2H, J 4,6 Hz, H-2,18); δ 8,77 (d, 2H, J 4,6 Hz, H-7,13); δ 8,63 – 8,54 (m, 4H, H-3,17,8,12)

RMN de ^{19}F (CDCl_3 ; 282,38 MHz): δ -160,70 (dd, 2F, J_1 24,4 J_2 7,5 Hz, F_{orto}); -161,13 (dd, 4F, J_1 23,3 J_2 6,4 Hz, F_{orto}); -175,54 - -175,77 (m, 2F, F_{para}); -176,25 (t, 1F, J 21,5 Hz, F_{para}); -184,85 - -184,98 (m, 4F, F_{meta}); -185,30 - -185,48 (m, 2F, F_{meta})

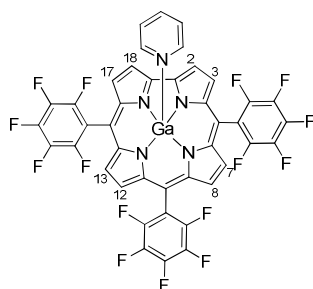
UV-Vis em DMSO λ_{max} (log ϵ): 434 (5,20), 543 (4,00), 584 (4,20), 614 (4,54)

EM ESI $^+$ m/z : 797,0854 $[\text{M}+\text{H}]^+$

5.3. Síntese de 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrolatogálio(III)(piridina) 4

Este composto foi sintetizado com base no procedimento descrito por Bendix *et al.*^[100]

A uma solução de 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrol (2,0 g, 251 mmol) em piridina seca (150 mL) adicionou-se um excesso de cloreto de gálio(III) (5,0 g). A mistura reaccional foi mantida em refluxo e sob atmosfera de árgon durante cerca de 2 horas. A reacção foi monitorizada por TLC e terminada quando todo o composto de partida foi consumido. Após arrefecimento até à temperatura ambiente, a mistura reaccional foi lavada com uma solução aquosa de ácido cítrico e a fase orgânica foi extraída com diclorometano e lavada (pelo menos duas vezes) com água destilada. De seguida, foi seca por sulfato de sódio anidro e evaporada à secura. O resíduo foi cristalizado numa mistura de diclorometano e hexano e os cristais do complexo de gálio(III) do corrol **4** obtidos quantitativamente.



RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300,13 MHz): δ 9,24 (d, 2H, J 4,1 Hz, H-2,18); 8,86 (d, 2H, J 4,6 Hz, H-7,13); 8,80 (d, 2H, J 4,1 Hz, H-3,17); 8,65 (d, 2H, J 4,6 Hz, H-8,12)

RMN de ^{19}F (CDCl_3 ; 282,38 MHz): δ -162,24 - -161,46 (m, 6F, F_{orto}); -177,32 (t, 2F, J 20,7 Hz, F_{para}); -177,51 (t, 1F, J 20,8 Hz, F_{para}); -185,83 - -186,28 (m, 6F, F_{meta})

UV-Vis em DMSO λ_{max} (log ϵ): 423 (5,42), 574 (4,38), 592 (4,40)

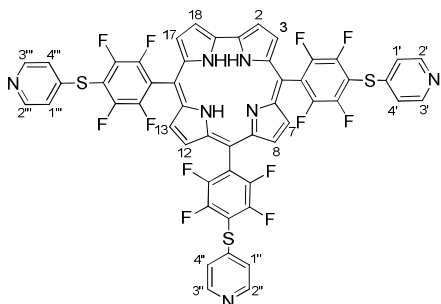
EM ESI $^+$ m/z : 862,9765 $[\text{M}-\text{Py}+\text{H}]^+$

5.4. Síntese de 5,10,15-tris[4-(piridin-4-ilsulfanil)-2,3,5,6-tetrafluorofenil]corrol 18

A 10 mg de **3** (12,6 μmol) adicionam-se 12 mg de 4-mercaptopiridina (8,6 eq., 0,11 mmol) e carbonato de potássio em 0,3 mL de DMSO seco num tubo reaccional selado. A reacção é mantida em atmosfera de azoto à temperatura ambiente, sob agitação e terminada ao fim de, aproximadamente, 2 horas (altura em que o composto tris-substituído é o composto maioritário). A mistura reaccional é neutralizada com uma solução aquosa de ácido cítrico, lavada com água destilada, a fase orgânica é extraída com diclorometano e seca por sulfato de sódio anidro. Posteriormente, esta é submetida a cromatografia *flash* em coluna e os seus constituintes separados, por aplicação de um gradiente de eluentes (clorofórmio e clorofórmio:acetato de etilo).

A fracção constituída pelo composto tris-substituído pretendido é, habitualmente, a quarta mancha roxa que surge, por ordem de eluição.

O composto cristaliza numa mistura de diclorometano e hexano à temperatura ambiente e obtém-se com um rendimento de 12%.



RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300,13 MHz): δ 9,16 (d, 2H, J 4,3 Hz, H-2,18); 8,84 (d, 2H, J 4,7 Hz, H-7,13); 8,66-8,63 (m, 4H, H-3,17,8,12); 8,33 (d, 4H, J 5,0 Hz, H-2',3',2'',3''); 8,11 (d, 2H, J 5,0 Hz, H-2'',3''); 7,23-7,20 (m, 4H, H-1',4',1'',4''); 7,16 (d, 2H, J 5,5 Hz, H-1'',4'')

RMN de ^{19}F (CDCl_3 ; 282,38 MHz): δ -154,40 (dd, 4F, J_1 25,0 J_2 12,3 Hz, F_{orto}); -154,83 (dd, 2F, J_1 25,1 J_2 12,8 Hz, F_{orto}); -158,91 (dd, 2F, J_1 25,1 J_2 12,8 Hz, F_{meta}); -159,57 (dd, 4F, J_1 25,0 J_2 12,3 Hz, F_{meta})

UV-Vis em DMSO λ_{max} (log ϵ): 445 (5,06), 544 (4,03), 582 (4,14) 623 (4,48)

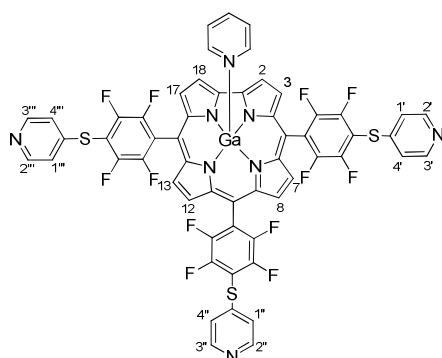
EM ESI $^+$ m/z : 1069,0980 $[\text{M}]^+$

5.5. Síntese de 5,10,15-tris[4-(piridin-4-ilsulfanil)-2,3,5,6-tetrafluorofenil]corrolatogálio(III)(piridina) 19

A síntese do 5,10,15-tris[4-(piridin-4-ilsulfanil)-2,3,5,6-tetrafluorofenil]corrolatogálio(III)(piridina) é, em tudo, semelhante à síntese do derivado não complexado.

Num tubo reaccional selado juntam-se 10 mg de **4** (10,6 μmol), 12 mg de 4-mercaptopiridina (10,2 eq., 0,11 mmol) e carbonato de potássio em excesso em 0,3 mL de DMSO seco. A reacção decorre à temperatura ambiente e sob agitação durante, aproximadamente, 1 hora e 40 minutos (período ao fim do qual o composto tris-substituído pretendido é maioritário e se começam a formar outros produtos). A reacção é terminada por adição de uma solução aquosa de ácido cítrico e, de seguida, lavada com água destilada. A fase orgânica é extraída com diclorometano e após passagem por sulfato de sódio anidro e evaporação à secura, esta é separada através de uma coluna de cromatografia preparada com sílica *flash*. O eluente utilizado é uma mistura de diclorometano:acetato de etilo:piridina de polaridade crescente, sendo que a mistura mais apolar consiste numa proporção de 150:50:1, respectivamente. De uma forma geral, o derivado tris-substituído corresponde à quarta fracção roxa a ser eluída.

Após ser recolhido, o composto é cristalizado em diclorometano e hexano, à temperatura ambiente, sendo obtido com um rendimento de 27%.



RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300,13 MHz): δ 9,31 (d, 2H, J 4,1 Hz, H-2,18); 8,98 (d, 2H, J 4,6 Hz, H-7,13); 8,91 (d, 2H, J 4,1 Hz, H-3,17); 8,77 (d, 2H, J 4,6, H-8,12); 8,60 - 8,64 (m, 6H, H-2',3',2'',3'',2''',3'''); 7,37 - 7,33 (m, 6H, H-1',4',1'',4'',1''',4''')

RMN de ^{19}F (CDCl_3 ; 282,38 MHz): δ -155,18 -

-155,50 (m, 6F, F_{orto}); -159,03 - -159,27 (m, 6F, F_{meta})

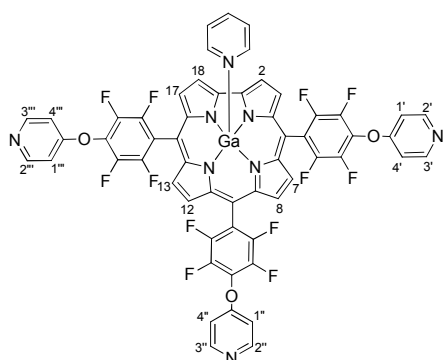
UV-Vis em DMSO λ_{max} (log ϵ): 436 (5,22), 575 (4,08) 607 (4,39)

EM ESI $^+$ m/z : 1136,0079 $[\text{M-py}+\text{H}]^+$

5.6. Síntese de 5,10,15-tris[4-(piridin-4-iloxi)-2,3,5,6-tetrafluorofenil]corrolatogálio(III)(piridina) **22**

Juntam-se 10 mg de corrol **4** (10,6 μmol), 6 mg de 4-hidroxipiridina (5,94 eq., 63,1 μmol) e carbonato de potássio em excesso a 0,3 mL de DMSO seco. A reacção, que decorre num tubo reaccional selado sob atmosfera de azoto, é colocada num banho de óleo a 40°C sob agitação. Ao fim de 1 hora de reacção adicionam-se 3 mg (2,97 eq., 31,5 μmol) de 4-hidroxipiridina e a reacção é mantida nas mesmas condições durante

mais 30 minutos. Ao fim deste período a mistura reaccional é deixada arrefecer e neutralizada com uma solução aquosa de ácido cítrico. A fase orgânica é extraída com diclorometano, lavada com água destilada e seca por sulfato de sódio anidro. De seguida, o solvente é evaporado e a mistura reaccional é aplicada no topo de uma coluna cromatográfica preenchida com sílica gel. A coluna é eluída com uma mistura de éter de petróleo:acetato de etilo:piridina na proporção de 150:50:1. O composto cristaliza numa mistura de diclorometano e hexano e é obtido com um rendimento de 10%.



RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300,13 MHz): δ 9,36 (d, 2H, J 4,1 Hz, H-2,18); 9,00 (d, 2H, J 4,6 Hz, H-3,17); 8,93 (d, 2H, J 4,1 Hz, H-7,13); 8,79 (d, 2H, J 4,6, H-8,12); 7,79 – 7,74 (m, 6H, H-1',4',1'',4'',1''',4'''); 6,76 – 6,70 (m, 6H, H-2',3',2'',3'',2''',3''')

RMN de ^{19}F (CDCl_3 ; 282,38 MHz): δ -158,37 - -158,61 (m, 6F, F_{orto}); -172,32 (dd, 4F, J_1 23,2 J_2 9,7, F_{meta}); -172,51 (dd, 2F, J_1 22,7 J_2 9,2, F_{meta})

UV-Vis em DMSO λ_{max} (log ϵ): 426 (5,32) 574 (4,19) 597 (4,33)

5.7. Procedimento geral para as reacções de substituição nucleófila com propan-1-ol, pentan-1-ol e octan-1-ol

Num tubo reaccional selado adiciona-se o corrol e o álcool a um excesso de carbonato de potássio em 0,3 mL de DMSO seco. A mistura reaccional é mantida sob atmosfera inerte de azoto e sob agitação à temperatura de 100°C e a sua evolução é controlada por TLC.

Terminada a reacção, a mistura reaccional é neutralizada com uma solução aquosa de ácido cítrico. A fase orgânica é extraída com diclorometano, lavada com água destilada, passada por sulfato de sódio anidro e evaporada à secura.

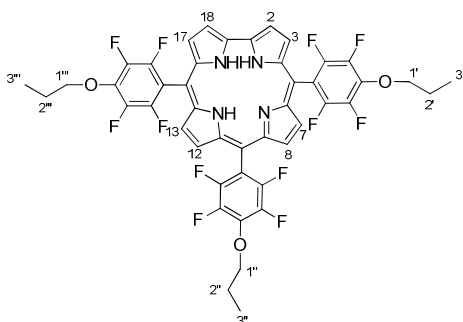
Os compostos obtidos são separados por cromatografia em coluna de sílica *flash* e o composto tris-substituído é, posteriormente, purificado por aplicação numa nova coluna cromatográfica. Os derivados de **3** são eluídos com uma mistura de éter de petróleo:diclorometano (4:1) e os derivados de **4** são eluídos com uma mistura de éter de petróleo:acetato de etilo:piridina (150:50:1).

Nalguns casos, o processo de purificação é essencial, visto que os compostos se degradam durante o processo de separação, originando outros compostos de cor esverdeada.

Uma vez que não se conseguiu cristalizar nenhum dos compostos sintetizados desta série, estes foram colocados em porta-amostras abertos, protegidos da luz, o que permitiu a evaporação do solvente.

5.7.1. Síntese de 5,10,15-tris(4-propoxi-2,3,5,6-tetrafluorofenil)corrol **29**

A síntese deste derivado consiste na adição de 10 mg de **3** (12,6 μmol) a 0,1 mL de propan-1-ol (106 eq., 1,34 mmol) e carbonato de potássio em DMSO seco. A reacção é mantida nas condições descritas durante 16 horas, tendo-se seguido o procedimento acima descrito. Após separação e purificação o derivado **29** é obtido com um rendimento de cerca de 38%.



RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300,13 MHz): δ 9,06 (d, 2H, J 4,3 Hz, H-2,18); 8,78 (d, 2H, J 4,7 Hz, H-7,13); 8,60 - 8,56 (m, 4H, H-3,17,8,12); 4,52 (t, 6H, J 6,5 Hz, $3\times\text{CH}_2$, H-1',1'',1'''); 2,03 (sex, 6H, J 7,1 Hz, $3\times\text{CH}_2$, H-2', 2'', 2'''); 1,22 (t, 9H, J 7,4 Hz, $3\times\text{CH}_3$, H-3', 3'', 3''')

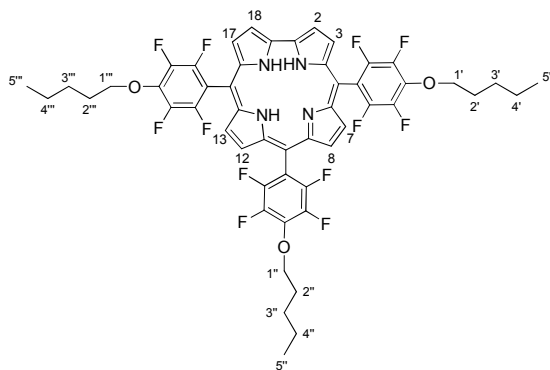
RMN de ^{19}F (CDCl_3 ; 282,38 MHz): δ -163,04 (dd, 2F, J_1 23,1 J_2 7,9 Hz, F_{orto}); -163,54 - -163,59 (m, 4F, F_{orto}); -180,70 (dd, 4F, J_1 22,4 J_2 6,5 Hz, F_{meta}); -181,14 (dd, 2F, J_1 23,1 J_2 7,9 Hz, F_{meta})

UV-Vis em DMSO λ_{max} (log ϵ): 435 (5,06), 585 (3,97), 618 (4,38)

EM ESI $^+$ m/z : 916,2277 [M] $^{+}$

5.7.2. Síntese de 5,10,15-tris(4-pentiloxi-2,3,5,6-tetrafluorofenil)corrol **31**

Utilizam-se 10 mg de **3** (12,6 μmol), 0,1 mL de pentan-1-ol (73,7 eq., 0,93 mmol) e carbonato de potássio em 0,3 mL de DMSO. A reacção é mantida nas condições acima descritas durante 20 horas. Após o tratamento da mistura reaccional o composto desejado é separado e purificado e corresponde, habitualmente, à terceira fracção de cor roxa a ser recolhida, sendo obtido com um rendimento de cerca de 34%.



RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300,13 MHz): δ 9,06 (d, 2H, J 4,3 Hz, H-2,18); 8,78 (d, 2H, J 4,7 Hz, H-7,13); 8,60 – 8,56 (m, 4H, H-3, 17,8,12); 4,55 (t, 6H, J 6,5 Hz, $3\times\text{CH}_2$, H-1,1'',1'''); 2,01 (qt, 6H, 7,0 J Hz, $3\times\text{CH}_2$, H-2',2'',2'''); 1,62-1,49 (m, 12H, $6\times\text{CH}_2$, H-3',4',3'',4'',3''',4'''); 1,04 (t, 9H, J 7,2

Hz, $3\times\text{CH}_3$, H-5',5'',5''')

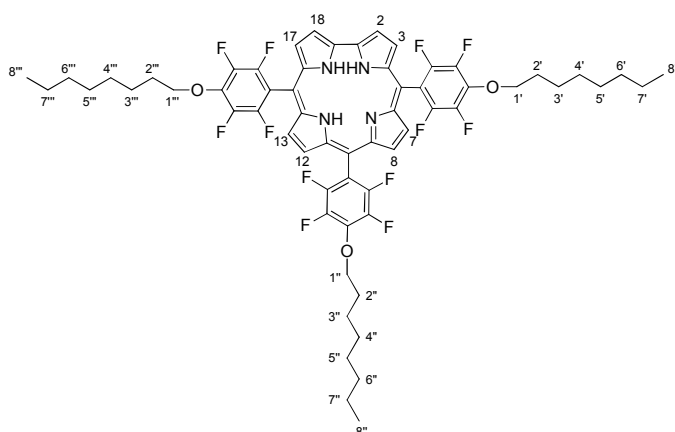
RMN de ^{19}F (CDCl_3 ; 282,38 MHz): δ -163,03 (dd, 2F, J_1 23,0 J_2 8,6, F_{orto}); -163,53 - -163,09 (m, 4F, F_{orto}); -180,68 (dd, 4F, J_1 22,9 J_2 6,4 Hz, F_{meta}); -181,11 (dd, J_1 23,0 J_2 8,6 Hz, F_{meta})

UV-Vis em DMSO λ_{max} (log ϵ): 435 (5,06), 585 (3,97), 618 (4,38)

EM ESI $^+$ m/z : 1000,3216 $[\text{M}]^+$

5.7.3. Síntese de 5,10,15-tris(4-octiloxi-2,3,5,6-tetrafluorofenil)corrol 33

Neste caso, o derivado pretendido é obtido utilizando 10 mg de **3** (12,6 μmol) aos quais se juntam 0,1 mL de octan-1-ol (50,4 eq., 0,63 mmol) e carbonato de potássio em 0,3 mL de DMSO seco. O tubo reaccional permaneceu nas condições descritas durante cerca de 23 horas. Seguiu-se o *work-up* da mistura reaccional e os processos de separação e de purificação já descritos. O composto tris-substituído é obtido com um rendimento de cerca de 66%.



RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300,13 MHz): δ 9,07 (d, 2H, J 4,3 Hz, H-2,18); 8,78 (d, 2H, J 4,7 Hz, H-7,13); 8,61-8,55 (m, 4H, H-3, 17,8,12); 4,55 (t, 6H, J 6,5 Hz, $3\times\text{CH}_2$, H-1',1'',1'''); 2,00 (qt, 6H, J 7,0 Hz $3\times\text{CH}_2$, H-2',2'',2'''); 1,74-1,58 (m, 12H, $6\times\text{CH}_2$, H-3',4',3'',4'',3''',4'''); 1,48-1,24 (m, 18H, $9\times\text{CH}_2$, H-5',6',7',5'',6'',7'',5''',6''',7'''); 0,92 (t, J 7,4 Hz, 9H)

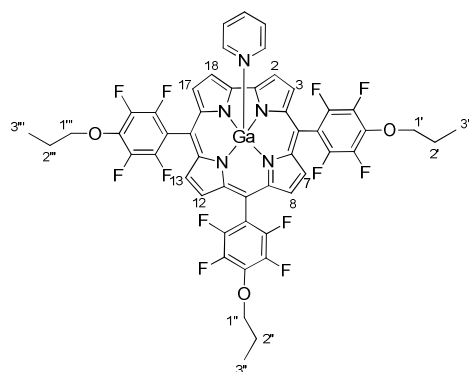
RMN de ^{19}F (CDCl_3 ; 282,38 MHz): δ -163,03 (dd, 2F, J_1 23,6 J_2 8,2 Hz, F_{orto}); -163,56 (dd, 4F, J_1 22,0 J_2 6,7 Hz, F_{orto}); -180,66 (dd, 4F, J_1 22,0 J_2 6,7 Hz, F_{meta}); -181,10 (dd, 2F, J_1 23,6 J_2 8,2 Hz, F_{meta})

UV-Vis em DMSO λ_{max} (log ϵ): 435 (5,02), 545 (3,70), 585 (3,90), 618 (4,36)

EM ESI $^+$ m/z : 1126,4625 $[\text{M}]^+$

5.7.4. Síntese de 5,10,15-tris(4-propoxi-2,3,5,6-tetrafluorofenil)corrolatogálio(III)(piridina) 30

Utilizam-se 10 mg de **4** (10,6 μmol) e 0,1 mL de propan-1-ol (126 eq., 1,34 mmol). A reacção é mantida nas condições descritas e terminada ao fim de, aproximadamente, 22 horas. Depois de lavada e extraída a fase orgânica, este derivado é purificado através de uma coluna de cromatografia em sílica *flash*, sendo obtido com um rendimento de 13%.



RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300,13 MHz): δ 9,21 (d, 2H, J 4,1 Hz, H-2,18); 8,88 (d, 2H, J 4,6 Hz, H-7,13); 8,81 (d, 2H, J 4,1 Hz, H-3,17); 8,66 (d, 2H, J 4,6 Hz, H-8,12); 4,54 – 4,47 (m, 6H, 3xCH₂, H-1',1'',1'''); 2,03 (sex, 6H, J 6,9 Hz, 3xCH₂, H-2',2'',2'''); 1,25-1,18 (m, 9H, 3xCH₃, H-3',3'',3''')

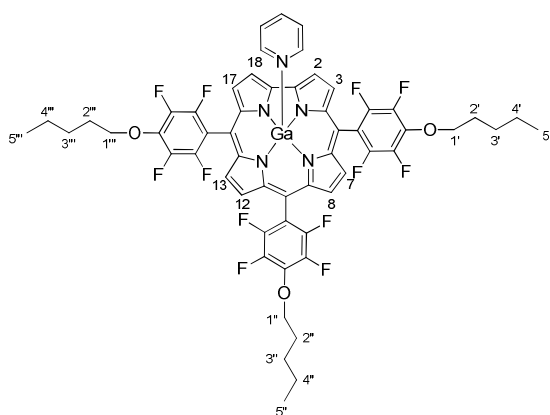
RMN de ^{19}F (CDCl_3 ; 282,38 MHz): δ -163,41 - -163,54 (m, 6F, F_{orto}); -181,47 (dd, 4F, J_1 23,4 J_2 8,6 Hz, F_{orto}); -181,69 (dd, 2F, J_1 24,0 J_2 7,9 F_{meta});

UV-Vis em DMSO λ_{max} (log ϵ): 428 (5,33), 537 (3,88), 577 (4,18), 605 (4,35)

EM ESI $^+$ m/z : 982,1298 $[\text{M-Py}]^+$

5.7.5. Síntese de 5,10,15-tris(4-pentiloxi-2,3,5,6-tetrafluorofenil)corrolatogálio(III)(piridina) 32

Para a obtenção do composto desejado utilizam-se 10 mg de **4** (10,6 μmol), 0,1 mL de pentan-1-ol (87,1 eq., 0,93 mmol) e carbonato de potássio em DMSO seco. Ao fim de 22 horas a reacção é terminada. Depois de lavada, extraída e seca, a fase orgânica é purificada e o derivado **32** é obtido com um rendimento de cerca de 39%.



RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300,13 MHz): δ 9,21 (d, 2H, J 3,9 Hz, H2-18); 8,88 (d, 2H, J 4,8 Hz, H-7,13); 8,81 (d, 2H, J 3,9 Hz, H-3,17); 8,66 (d, 2H, J 4,8 Hz, H-8,12); 4,58 – 4,51 (m, 6H, $3\times\text{CH}_2$, H-1',1'',1'''); 1,67-1,50 (m, 12H, $6\times\text{CH}_2$, H-2',3',2'',3'',2''',3'''); 1,07 – 1,01 (m, 6H, $3\times\text{CH}_3$, H-4',4'',4'''); 0,89-0,85 (m, 9H,

$3\times\text{CH}_2$, H-5',5'',5''')

RMN de ^{19}F (CDCl_3 ; 282,38 MHz): δ -163,43 - -163,54 (m, 6F, F_{orto}); -181,38 - -181,50 (m, 4F, F_{meta}); -181,60 - -181,72 (m, 2F, F_{meta})

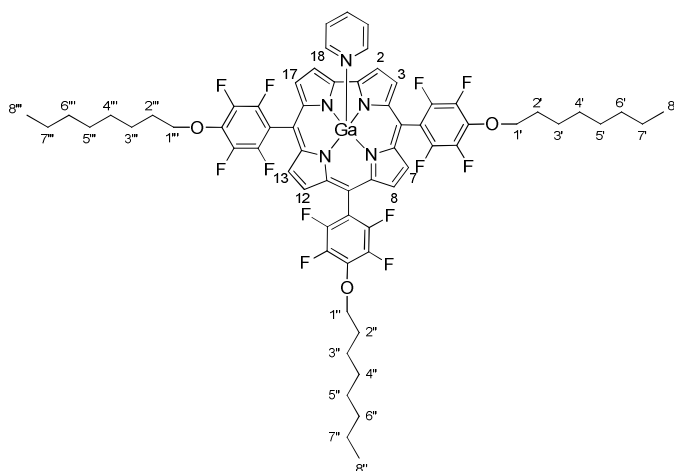
UV-Vis em DMSO λ_{max} (log ϵ): 428 (5,46), 537 (3,99), 578 (4,31), 605 (4,47)

EM ESI $^+$ m/z : 1066,2237 [M-Py] $^{++}$

5.7.6. Síntese de 5,10,15-tris(4-octiloxi-2,3,5,6-tetrafluorofenil)corrolatogálio(III)

Utilizam-se 10 mg de **4** (10,6 μmol), às quais se juntam 0,1 mL de octan-1-ol (59,6 eq., 63,3 mmol) e carbonato de potássio em DMSO seco. A reacção é mantida nas condições acima descritas durante cerca de 23 horas. Findo este período, a mistura reaccional é tratada de acordo com o procedimento já descrito.

O composto tris-substituído é purificado, sendo obtido com um rendimento de 79%.



RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300,13 MHz): δ 9,21 (d, 2H, J 4,1 Hz, H-2,18); 8,88 (d, 2H, J 4,6 Hz, H-7-13); 8,81 (d, 2H, J 4,1 Hz, H-3,17); 8,66 (d, 2H, J 4,6 Hz, H-8,12); 4,57 – 4,51 (m, 6H, $3\times\text{CH}_2$, H-1',1'',1'''); 2,06-1,94 (m, 12H, $3\times\text{CH}_2$, H-2',3',2'',3'',2''',3'''); 1,68-1,61

(m, 6H, 3xCH₂, H-4',4'',4'''); 1,47-1,41 (m, 12H, 6xCH₂, H-5',6',5'',6'',5''',6'''); 1,39-1,35 (m, 6H, 3x CH₂, H-7',7'',7'''); 0,97-0,91 (m, 9H, 3xCH₃, H-8',8'',8''')

RMN de ¹⁹F (CDCl₃; 282,38 MHz): δ -163,43 - -163,54 (m, 6F, F_{orto}); -181,42 (dd, 4F, *J*_I 23,4 *J*₂ 8,5 Hz, F_{meta}); -181,64 (dd, 2F, *J*_I 23,6 *J*₂ 9,1 Hz, F_{meta})

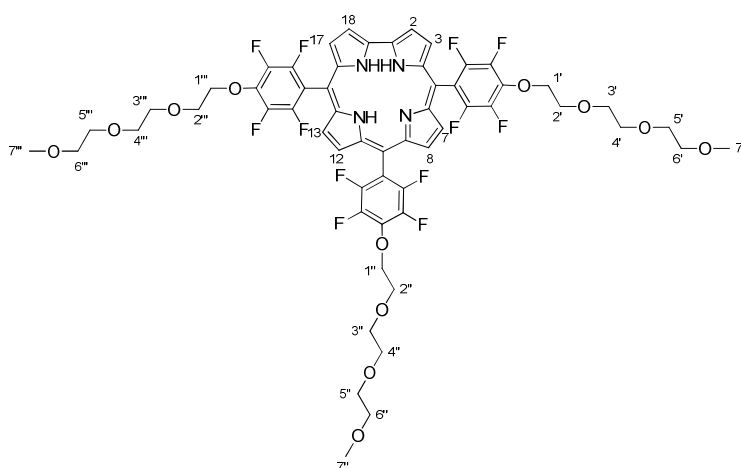
UV-Vis em DMSO λ_{max} (log ε): 428 (5,17), 538 (3,76), 578 (4,04), 605 (4,20)

EM ESI⁺ *m/z*: 1192,3646 [M-py]⁺

5.8. Síntese de 5,10,15-tris[2,3,5,6-tetrafluoro-4-(3,6,9-trioxadeciloxi)fenil]corrol 35

Para a síntese do composto **35** adicionam-se 45 µL de éter monometílico de trietilenoglicol (22,4 eq., 0,28 mmol) a 10 mg de **3** (12,6 µmol) e carbonato de potássio em excesso em 0,3 mL de DMF seca. A mistura reaccional, num tubo selado, é mantida sob atmosfera inerte de azoto num banho de óleo a 60°C e terminada ao fim de, aproximadamente, 22 horas.

A mistura reaccional é neutralizada com uma solução aquosa de ácido cítrico, a fase orgânica retomada em diclorometano e lavada com água destilada. A separação dos compostos obtidos é feita por cromatografia em coluna de sílica *flash* com uma mistura de acetato de etilo e diclorometano. Tal como no caso dos derivados substituídos com os álcoois, não se consegue cristalizar este composto, sendo obtido por evaporação do solvente.



RMN de ¹H (CDCl₃; 300,13 MHz): δ 9,07 (d, 2H, *J* 4,3 Hz, H-2,18); 8,78 (d, 2H, *J* 4,7 Hz, H-7,13); 8,62-8,54 (m, 4H, H-3,17,8,12); 4,76-4,68 (m, 6H, 3xCH₂, H-1',1'',1'''); 4,08-4,02 (m, 6H, 3xCH₂, H-2',2'',2'''); 3,89-3,86 (m, 6H, 3xCH₂,

H-3',3'',3'''); 3,80-3,77 (m, 6H, 3xCH₂, H-4',4'',4'''); 3,75-3,72 (m, 6H, 3xCH₂, H-5',5'',5'''); 3,62-3,59 (m, 6H, 3xCH₂, H-6',6'',6'''); 3,40 (s, 6H, 3xCH₃, H-7',7'',7'''); 3,39 (s, 3H, CH₃, H-7')

RMN de ^{19}F (CDCl_3 ; 282,38 MHz): δ -162,99 (dd, 2F, J_1 23,4 J_2 8,4 Hz, F_{orto}); -163,50 (dd, 4F, J_1 21,8 J_2 6,5 Hz, F_{orto}); -180,35 (dd, 4F, J_1 21,8 J_2 6,5 Hz, F_{meta}); -180,80 (dd, 2F, J_1 23,4 J_2 8,4 Hz, F_{meta})

UV-Vis em DMSO λ_{max} (log ϵ): não calculado devido à instabilidade do composto

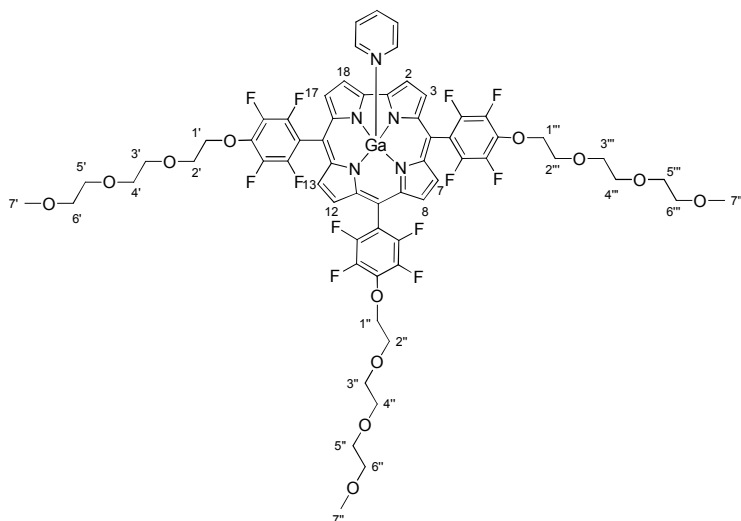
EM ESI $^+$ m/z : 1229,3776 $[\text{M}+\text{H}]^{+}$

5.9. Síntese de 5,10,15-tris[2,3,5,6-tetrafluoro-4-(3,6,9-trioxadeciloxi)fenil]corrol atogálio(III)(piridina) 36

Para a síntese deste composto juntam-se 45 μL de éter monometílico de trietilenoglicol (26,5 eq., 0,28 mmol) a 10 mg de **4** (10,6 μmol) e um excesso de carbonato de potássio em 0,3 mL de DMF seca. A reacção é levada a cabo num tubo reaccional selado, sob atmosfera inerte de azoto, e mantida sob agitação num banho de óleo a 60°C, durante cerca de 41 horas.

A mistura reaccional é neutralizada, extraída com diclorometano e lavada com água destilada. Segue-se a separação por cromatografia em coluna de sílica *flash* com uma mistura de éter de petróleo:acetato de etilo:piridina (150:50:1).

O composto desejado é obtido por evaporação do solvente com um rendimento de 15%.



RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300,13 MHz): δ 9,2 (d, 2H, J 4,0 Hz, H-2,18); 8,87 (d, 2H, J 4,7 Hz, H-7,13); 8,80 (d, 2H, J 4,0 Hz, H-3,17); 8,65 (d, 2H, J 4,7 Hz, H-8,12); 4,72-4,67 (m, 6H, 3xCH₂, H-1',1'',1'''); 4,07-4,02 (m, 6H, 3xCH₂, H-2',2'',2'''); 3,89-3,85 (m,

6H, 3xCH₂, H-3',3'',3'''); 3,82-3,70 (m, 12H, 3xCH₂, H-4',5',4'',5'',4''',5'''); 3,62-3,59 (m, 6H, 3xCH₂, H-6',6'',6'''); 3,39 (s, 6H, 2xCH₃, H-7',7'''); 3,37 (s, 3H, CH₃, H-7'')

RMN de ^{19}F (CDCl_3 ; 282,38 MHz): δ -163,37- -163,48 (m, 6F, F_{orto}); -181,12 (dd, 4F, J_1 23,4 J_2 9,0 Hz, F_{meta}); -181,35 (dd, 2F, J_1 24,0 J_2 9,6 Hz, F_{meta})

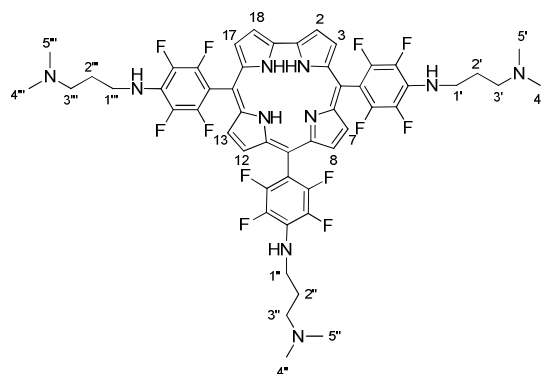
UV-Vis em DMSO λ_{max} (log ϵ): não calculado devido à instabilidade do composto

EM MALDI-TOF m/z : 1296,2 $[\text{M-Py}+\text{H}]^{+}$

5.10. Síntese de 5,10,15-tris{4-[3-(dimetilamino)propilamino]-2,3,5,6-tetrafluorofenil}corrol 37

Num tubo reaccional selado adicionam-se 20 μL de 3-dimetilamino-1-propilamina (12,7 eq., 0,16 mmol) a 10 mg de **3** (12,6 μmol) e carbonato de potássio em 0,3 mL de DMSO seco. A mistura reaccional é colocada sob agitação, em atmosfera de azoto, a 80°C. A reacção é monitorizada por TLC e terminada ao fim de, aproximadamente, 3 horas. Depois de terminada a reacção, a mistura reaccional é neutralizada com uma mistura aquosa de ácido cítrico, lavada com água destilada e a fase orgânica extraída com diclorometano.

Habitualmente, o derivado tris-substituído é purificado apenas por cristalização numa mistura de diclorometano e hexano, sendo obtido com um rendimento de 58%.



RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300,13 MHz): δ 9,09-8,56 (m, 8H, H-2,3,7,8,12,13,17,18); 3,81-3,69 (m, 6H, 3xCH₂, H-1',1'',1'''); 2,56-2,43 (m, 6H, 2xCH₃, H-3',3'',3'''); 2,29 (s, 12H, 4xCH₃, H-4',4'',5',5'''); 2,17 (s, 6H, 2xCH₃, H-4'',5''); 1,96-1,83 (m, 6H, 3xCH₂, H-2',2'',2''')

RMN de ^{19}F (CDCl_3 ; 282,38 MHz): δ -164,92 - -165,83 (m, 6F, F_{orto}); -184,40 - -184,79 (m, 6F, F_{meta})

UV-Vis em DMSO λ_{max} (log ϵ): 430 (5,38), 585 (4,54), 622 (4,84)

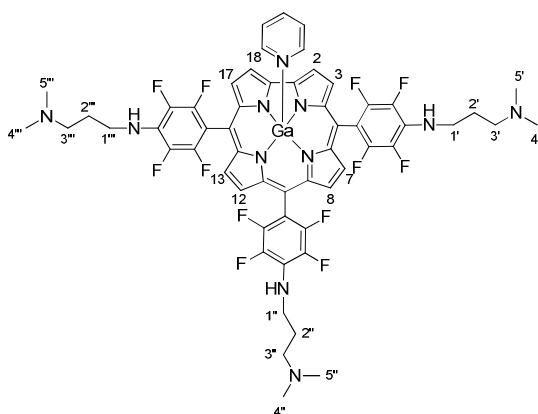
EM ESI⁺ m/z : 1042,4023 $[\text{M}]^{+}$

5.11. Síntese de 5,10,15-tris{4-[3-(dimetilamino)propilamino]-2,3,5,6-tetrafluorofenil}corrolatogálio(III)(piridina) 38

Utilizam-se 10 mg de **4** (10,6 μmol), às quais se juntam 20 μL de DMAPA (15 eq., 0,16 mmol) e carbonato de potássio em excesso em 0,3 mL de DMSO. A reacção é

deixada num tubo reaccional selado, sob atmosfera de azoto, num banho de óleo a 80°C durante cerca de 2,5 horas, altura em que todo o corrol de partida está convertido no respectivo derivado tris-substituído pretendido (também se verifica, por vezes, alguma degradação).

Findo este período, a mistura reaccional é neutralizada com uma solução aquosa de ácido cítrico, extraída com diclorometano e lavada com água destilada. Após a fase orgânica ser passada por sulfato de sódio anidro, a mistura é evaporada à secura. Segue-se a cristalização como processo de purificação do 5,10,15-tris[4-(3-dimetilamino-1-propilamina)-2,3,5,6-tetrafluorofenil]corrolatogálio(III)(piridina) numa mistura de diclorometano e hexano. Após filtração dos cristais, o derivado é obtido com um rendimento de 63%.



RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300,13 MHz): δ 9,16 (d, 2H, J 4,0 Hz, H-2,18); 8,91 (d, 2H, J 4,6 Hz, H-7,13); 8,82 (d, 2H, J 4,0 Hz, H-3,17); 8,68 (d, 2H, J 4,6 Hz, H-8,12); 3,84 – 3,72 (multiplete, 6H, H-1',1'',1''') 2,10 – 1,91 (m, 12H, 6xCH₂, H-2',3',2'',3'',2''',3'''); 1,25 (s, 18H, 6xCH₃, H-4',5',4'',5'',4''',5''');

RMN de ^{19}F (CDCl_3 ; 282,38 MHz): δ -163,37 - -163,48 (m, 6F, Forto); -181,12 (dd, 4F, J_1 23,4 J_2 9,0 Hz, Fmeta); -181,35 (dd, 2F, J_1 24,0 J_2 9,6 Hz);

UV-Vis em DMSO λ_{max} (log ϵ): 426 (5,40), 537 (3,99), 577 (4,27), 609 (4,50)

EM ESI⁺ m/z : 1109,3122 [M-py+H]⁺

5.12. Procedimento geral para as reacções de metilação

Num tubo reaccional selado adiciona-se o derivado a ser alquilado e iodeto de metilo em excesso. A reacção é levada a cabo em DMF seca, a 40°C, durante a noite e sob agitação.

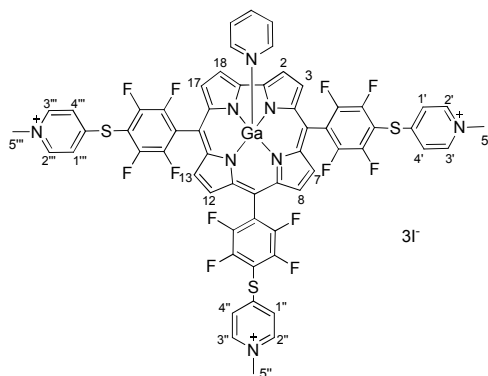
Findo o período reaccional, o tubo selado é colocado em gelo e adiciona-se éter etílico para o composto catiónico precipitar. De seguida, filtra-se o precipitado através de um funil de vidro com algodão e o sólido é lavado várias vezes com éter etílico.

Posteriormente, dissolve-se o precipitado numa mistura de metanol:água que, posteriormente, é evaporada à secura.

Os compostos são precipitados numa mistura de metanol e éter etílico.

5.12.1. Síntese de tri-iodeto de 5,10,15-tris[4-(1-metilpiridínio-4-ilsulfanil)-2,3,5,6-tetrafluorofenil]corrolatogálio(III)(piridina) **20**

Utilizam-se 18,2 mg de **19** (14,97 μmol), 2,0 mL de CH_3I (3,19 mmol) e 3,0 mL de DMF. A reacção é deixada nas condições referidas durante a noite. Terminado o período de reacção, a mistura é tratada de acordo com o procedimento geral descrito e o derivado **20** é obtido quantitativamente.



RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300,13 MHz): δ 9,37 (d, 2H, J 4,0 Hz, H-2,18); 9,20 (d, 2H, J 4,4 Hz, H-7,13); 9,07 (d, 2H, J 4,0 Hz, H-3,17); 9,0 (d, 2H, J 4,4 Hz, H-8,12); 8,85 (d, 6H, J 6,6 Hz, H-2',3',2'',3'',2''',3'''); 8,23 (d, 6H, J 6,6 Hz, H-1',4',1'',4'',1''',4'''); 4,42 (s, 9H, $3\times\text{CH}_3$, H-5',5'',5''')

RMN de ^{19}F (CDCl_3 ; 282,38 MHz): δ -157,59 - -157,85 (m, 6F, F_{orto}); -160,46 - -160,79 (m, 6F, F_{meta})

UV-Vis em DMSO λ_{max} (log ϵ): 430 (5,10), 577 (4,67), 596 (4,51)

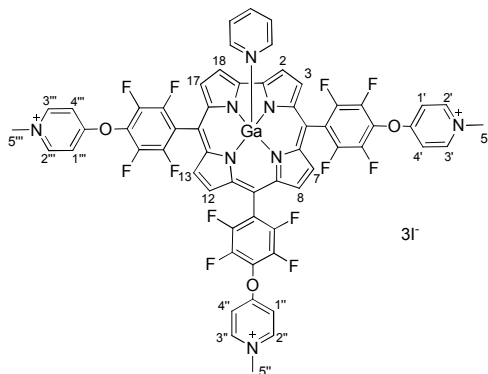
EM ESI $^+$ m/z : 589,5311 [M-Py-H] $^{2+}$

5.12.2. Síntese de tri-iodeto de 5,10,15-tris[4-(1-metilpiridínio-4-iloxi)-2,3,5,6-tetrafluorofenil]corrolatogálio(III)(piridina) **23**

Utilizam-se 17,3 mg de **22** (14,97 μmol), 2,0 mL de CH_3I (3,19 mmol) e 3,0 mL de DMF. A reacção é deixada nas condições referidas durante a noite. Terminado o período de reacção, a mistura é tratada de acordo com o procedimento geral descrito e o derivado **23** é obtido quantitativamente.

RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300,13 MHz): δ 9,40 (d, 2H, J 4,1 Hz, H-2,18); 9,16 (d, 2H, J 4,8 Hz, H-7,13); 9,04 (d, 2H, J 4,1 Hz, H-3,17); 8,96 (d, 2H, J 4,4 Hz, H-8,12); 8,39 – 8,30

(m, 6H, H-2',3',2'',3'',2''',3'''); 6,85 – 6,89 (m, 6H, H-1',4',1'',4'',1''',4'''); 3,37 (s, 3H, CH₃, H-5''); 3,22 (s, 6H, 2xCH₃, H-5',5''')



RMN de ¹⁹F (CDCl₃; 282,38 MHz): δ -162,46 - -162,73 (m, 6F, F_{orto}); -175,30 - -175,52 (m, 6F, F_{meta})

UV-Vis em DMSO λ_{max} (log ε): 424 (5,22) 572 (4,04) 592 (4,28)

5.13. Ensaios biológicos

As células bacterianas estavam acondicionadas a -80°C em 10% de glicerol. Foram utilizadas culturas frescas mantidas em meio BOSS sólido a 4% (1% peptona, 0,3% extracto de carne, 0,1 % glicerol, 3% NaCl, 1,5% agar, pH 7,3). Para cada ensaio inoculou-se, em assepsia, uma colónia isolada em 30 mL de meio BOSS líquido durante um dia a 25°C e sob agitação (120 rpm). Subcultivou-se uma alíquota desta cultura (240 mL) em 30 µL de meio BOSS líquido que se deixou a crescer durante uma noite a 25°C sob agitação (120 rpm), de modo a atingir uma densidade óptica a 620 nm perto de 1,0 (DO₆₂₀ ≈ 1,0), o que corresponde a cerca de 10⁸ células/mL.

REFERÊNCIAS

- [1] Page, K.; Wilson, M.; Parkin, I. P., *J. Mater. Chem.* **2009**, *19* (23), 3819-3831.
- [2] You, L.; Shen, H.; Shi, L.; Zhang, G.; Liu, H.; Wang, H.; Ji, L., *Sci. China Phys. Mech. Astron.* **2010**, *53* (8), 1491-1496.
- [3] Cao, Z. B.; Sun, Y. Y., *ACS App. Mater. Interfaces* **2009**, *1* (2), 494-504.
- [4] Johnson, A. W.; Price, R., *J. Chem. Soc.* **1960**, (Apr), 1649-1653.
- [5] The nobel prize in physiology or medicine 1934. http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1934/press.html (último acesso 05/07/2011).
- [6] Minot, G. R.; Murphy, W. P., *J. Am. Med. Ass.* **1926**, *87*, 470-476.
- [7] Rickes, E. L.; Brink, N. G.; Koniuszy, F. R.; Wood, T. R.; Folkers, K., *Science* **1948**, *107* (2781), 396-397.
- [8] Smith, E. L.; Parker, L. F. J., *Biochem. J.* **1948**, *43* (1), R8-R9.
- [9] Vitamin basics - the facts about vitamins in nutrition <http://www.vitamin-basics.com/index.php?id=57> (último acesso 05/07/2011).
- [10] Hodgkin, D. C.; Pickworth, J.; Robertson, J. H.; Trueblood, K. N.; Prosen, R. J.; White, J. G., *Nature* **1955**, *176* (4477), 325-328.
- [11] The nobel prize in chemistry 1964. http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1964/press.html. (último acesso 05/07/2011)
- [12] Adriaanse, C., *Journal of the 41st International Chemistry Olympiad* **2009**, (4), 3.
- [13] Johnson, A. W.; Kay, I. T., *Proc. Chem. Soc. London* **1961**, (May), 168.
- [14] Harrison, H. R.; Hodder, O. J. R.; Hodgkin, D. C., *J. Chem. Soc. B* **1971**, (4), 640.
- [15] (a) Gross, Z.; Galili, N.; Saltsman, I., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38* (10), 1427-1429; (b) Gross, Z.; Galili, N.; Simkhovich, L.; Saltsman, I.; Botoshansky, M.; Blaser, D.; Boese, R.; Goldberg, I., *Org. Lett.* **1999**, *1* (4), 599-602; (c) Paolesse, R.; Jaquinod, L.; Nurco, D. J.; Mini, S.; Sagone, F.; Boschia, T.; and Smith, K. M., *Chem. Commun.* **1999**, 1307-1308.
- [16] Dyke, J. M.; Hush, N. S.; Williams, M. L.; Woolsey, I. S., *Mol. Phys.* **1971**, *20* (6), 1149.
- [17] Ghosh, A.; Jynge, K., *Chem. Eur. J.* **1997**, *3* (5), 823-833.

- [18] Aviv-Harel, I.; Gross, Z., *Chem. Eur. J.* **2009**, *15* (34), 8382-8394.
- [19] Ding, T.; Harvey, J. D.; Ziegler, C. J., *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2005**, *9* (1), 22-27.
- [20] *Pure App. Chem.* **1976**, *48*, 495-502.
- [21] Simkhovich, L.; Goldberg, I.; Gross, Z., *J. Inorg. Biochem.* **2000**, *80* (3-4), 235-238.
- [22] Sessler, J. L.; Weghorn, S. J., *Expanded, contracted & isomeric porphyrins*. 1st ed.; Pergamon: Oxford, **1997**; Vol. 15.
- [23] Paolesse, R., Heteroporphyrins, expanded porphyrins and related macrocycles. In *The Porphyrin Handbook*, Kadish, K. M.; Smith, K. M.; Guillard, R., Eds. Academic Press: **2000**; Vol. 2, pp 201-232.
- [24] Mahammed, A.; Weaver, J. J.; Gray, H. B.; Abdelas, M.; Gross, Z., *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* (10), 2077-2079.
- [25] Ding, T.; Aleman, E. A.; Modarelli, D. A.; Ziegler, C. J., *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109* (33), 7411-7417.
- [26] Gryko, D. T.; Fox, J. P.; Goldberg, D. P., *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2004**, *8* (9), 1091-1105.
- [27] (a) Stavitski, E.; Berg, A.; Ganguly, T.; Mahammed, A.; Gross, Z.; Levanon, H., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (22), 6886-6890; (b) Weaver, J. J.; Sorasaene, K.; Sheikh, M.; Goldschmidt, R.; Tkachenko, E.; Gross, Z.; Gray, H. B., *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2004**, *8* (1-3), 76-81.
- [28] Erben, C.; Will, S.; Kadish, K. M., Metalocorroles: Molecular structure, spectroscopy and electronic states. In *The Porphyrin Handbook*, Kadish, K. M.; Smith, K. M.; Guillard, R., Eds. Academic Press: **2000**; Vol. 2, pp 233-295.
- [29] Aviv, I.; Gross, Z., *Chem. Commun.* **2007**, (20), 1987-1999.
- [30] Paolesse, R.; Nardis, S.; Stefanelli, M.; Fronczek, F. R.; Vicente, M. G. H., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (20), 3047-3050.
- [31] Aviv-Harel, I.; Gross, Z., *Coord. Chem. Rev.* **2011**, *255* (7-8), 717-736.
- [32] (a) Grodkowski, J.; Neta, P.; Fujita, E.; Mahammed, A.; Simkhovich, L.; Gross, Z., *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106* (18), 4772-4778; (b) Collman, J. P.; Kaplun, M.; Decreau, R. A., *Dalton Trans.* **2006**, (4), 554-559.
- [33] Paolesse, R.; Nardis, S.; Sagone, F.; Khoury, R. G., *J. Org. Chem.* **2001**, *66* (2), 550-556.

- [34] Golubkov, G.; Bendix, J.; Gray, H. B.; Mahammed, A.; Goldberg, I.; DiBilio, A. J.; Gross, Z., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40* (11), 2132-2134.
- [35] Saltsman, I.; Mahammed, A.; Goldberg, I.; Tkachenko, E.; Botoshansky, M.; Gross, Z., *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (25), 7411-7420.
- [36] (a) Paolesse, R.; Jaquinod, L.; Senge, M. O.; Smith, K. M., *J. Org. Chem.* **1997**, *62* (18), 6193-6198; (b) Paolesse, R.; Marini, A.; Nardis, S.; Froiio, A.; Mandoj, F.; Nurco, D. J.; Prodi, L.; Montalti, M.; Smith, K. M., *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2003**, *7* (1), 25-36.
- [37] Barata, J. F. B. Estudos de síntese e reactividade de novos derivados do tipo corrol. Tese de Doutoramento, Universidade de Aveiro, Aveiro, **2009**.
- [38] Barata, J. F. B.; Silva, A. M. G.; Faustino, M. A. F.; Neves, M. G. P. M. S.; Tome, A. C.; Silva, A. M. S.; Cavaleiro, J. A. S., *Synlett* **2004**, (7), 1291-1293.
- [39] (a) Vale, L. S. H. P.; Barata, J. F. B.; Neves, M. G. P. M. S.; Faustino, M. A. F.; Tome, A. C.; Silva, A. M. S.; Paz, F. A. A.; Cavaleiro, J. A. S., *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48* (50), 8904-8908; (b) Barata, J. F. B.; Neves, M. G. P. M. S.; Tome, A. C.; Cavaleiro, J. A. S., *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2009**, *13* (4-5), 415-418; (c) Vale, L. S. H. P.; Barata, J. F. B.; Santos, C. I. M.; Neves, M. G. P. M. S.; Faustino, M. A. F.; Tome, A. C.; Silva, A. M. S.; Paz, F. A. A.; Cavaleiro, J. A. S., *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2009**, *13* (3), 358-368.
- [40] Hiroto, S.; Hisaki, I.; Shinokubo, H.; Osuka, A., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (41), 6763-6766.
- [41] Hori, T.; Osuka, A., *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 2379-2386.
- [42] Ventura, B.; Degli Esposti, A.; Koszarna, B.; Gryko, D. T.; Flamigni, L., *New J. Chem.* **2005**, *29* (12), 1559-1566.
- [43] Barata, J. F. B.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Faustino, M. A. F.; Silva, A. M. S.; Cavaleiro, J. A. S., *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51* (12), 1537-1540.
- [44] (a) Johnson, A. W.; Kay, I. T., *J. Chem. Soc.* **1965**, (Mar), 1620-&; (b) Paolesse, R.; Licoccia, S.; Fanciullo, M.; Morgante, E.; Boschi, T., *Inorg. Chim. Acta* **1993**, *203* (1), 107-114; (c) Paolesse, R.; Licoccia, S.; Bandoli, G.; Dolmella, A.; Boschi, T., *Inorg. Chem.* **1994**, *33* (6), 1171-1176; (d) Loim, N. M.; Grishko, E. V.; Pyshnograeva, N. I.; Vorontsov, E. V.; Sokolov, V. I., *Russ. Chem. B+* **1994**, *43* (5), 871-873; (e) Rose, E.; Kossanyi, A.; Quelquejeu, M.; Soleilhavoup, M.; Duwavran, F.; Bernard, N.; Lecas, A., *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (6), 1567-1568; (f) Neya, S.; Ohyama, K.; Funasaki, N., *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38* (23), 4113-4116.

- [45] Rothmund, P., *J. Am. Chem. Soc.* **1935**, *57*, 2010-2011.
- [46] Ka, J. W.; Cho, W. S.; Lee, C. H., *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41* (42), 8121-8125.
- [47] Collman, J. P.; Decreau, R. A., *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* (6), 1207-1210.
- [48] Gryko, D. T.; Koszarna, B., *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1* (2), 350-357.
- [49] Koszarna, B.; Gryko, D. T., *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47* (35), 6205-6207.
- [50] Koszarna, B.; Gryko, D. T., *J. Org. Chem.* **2006**, *71* (10), 3707-3717.
- [51] Kumari, P.; Chauhan, S. M. S., *J. Heterocycl. Chem.* **2008**, *45* (3), 779-783.
- [52] Lindsey, J. S.; Wagner, R. W., *J. Org. Chem.* **1989**, *54* (4), 828-836.
- [53] Dogutan, D. K.; Stoian, S. A.; McGuire, R.; Schwalbe, M.; Teets, T. S.; Nocera, D. G., *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (1), 131-140.
- [54] (a) Gryko, D. T., *Chem. Commun.* **2000**, (22), 2243-2244; (b) Gryko, D. T.; Jadach, K., *J. Org. Chem.* **2001**, *66* (12), 4267-4275.
- [55] (a) Gryko, D. T., *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, (11), 1735-1743; (b) Nardis, S.; Monti, D.; Paolesse, R., *Mini-Rev. Org. Chem.* **2005**, *2* (4), 355-372; (c) Gryko, D. T., *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2008**, *12* (8), 906-917.
- [56] Gross, Z.; Simkhovich, L.; Galili, N., *Chem. Commun.* **1999**, (7), 599-600.
- [57] Mahammed, A.; Gross, Z., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (9), 2883-2887.
- [58] Paolesse, R.; Di Natale, C.; Macagnano, A.; Sagone, F.; Scarselli, M. A.; Chiaradia, P.; Troitsky, V. I.; Berzina, T. S.; D'Amico, A., *Langmuir* **1999**, *15* (4), 1268-1274.
- [59] Langmuir–blodgett film.
http://en.wikipedia.org/wiki/Langmuir%E2%80%93Blodgett_film#Applications (último acesso 05/07/2011).
- [60] Barbe, J. M.; Canard, G.; Brandes, S.; Jerome, F.; Dubois, G.; Guillard, R., *Dalton Trans.* **2004**, (8), 1208-1214.
- [61] Li, C. Y.; Zhang, X. B.; Han, Z. X.; Akermark, B.; Sun, L. C.; Shen, G. L.; Yu, R. Q., *Analyst* **2006**, *131* (3), 388-393.
- [62] Radecki, J.; Stenka, I.; Dolusic, E.; Dehaen, W., *Electrochim. Acta* **2006**, *51* (11), 2282-2288.
- [63] Walker, D.; Chappel, S.; Mahammed, A.; Brunschwig, B. S.; Winkler, J. R.; Gray, H. B.; Zaban, A.; Gross, Z., *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2006**, *10* (11), 1259-1262.
- [64] Aviezer, D.; Cotton, S.; David, M.; Segev, A.; Khaselev, N.; Galili, N.; Gross, Z.; Yayan, A., *Cancer Res.* **2000**, *60* (11), 2973-2980.

- [65] Haber, A.; Aviram, M.; Gross, Z., *Chem. Sci.* **2011**, 2 (2), 295-302.
- [66] (a) Agadjanian, H.; Ma, J.; Rentsendorj, A.; Valluripalli, V.; Hwang, J. Y.; Mahammed, A.; Farkas, D. L.; Gray, H. B.; Gross, Z.; Medina-Kauwe, L. K., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, 106 (15), 6105-6110; (b) Agadjanian, H.; Weaver, J. J.; Mahammed, A.; Rentsendorj, A.; Bass, S.; Kim, J.; Dmochowski, I. J.; Margalit, R.; Gray, H. B.; Gross, Z.; Medina-Kauwe, L. K., *Pharm. Res.* **2006**, 23 (2), 367-377; (c) Mahammed, A.; Gray, H. B.; Weaver, J. J.; Sorasaene, K.; Gross, Z., *Bioconjugate Chem.* **2004**, 15 (4), 738-746.
- [67] Wilson, B. C.; Patterson, M. S., *Phys. Med. Biol.* **2008**, 53 (9), 61-109.
- [68] Almeida, A.; Cunha, A.; Faustino, M. A.; Tomé, A. C.; Neves, M. G. P. M. S., Porphyrins as antimicrobial photosensitizing agents. In *Photodynamic inactivation of microbial pathogens. Medical and environmental applications*, in Press.
- [69] Castano, A. P.; Demidova, T. N.; Hamblin, M. R., *Photodiagn. Photodyn.* **2004**, (1), 279-293.
- [70] Faustino, M. A. Síntese de novas porfirinas e avaliação biológica das suas propriedades em terapia fotodinâmica. Tese de Doutorado, Universidade de Aveiro, Aveiro, **1999**.
- [71] Hamblin, M. R.; Hasan, T., *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, 3 (5), 436-450.
- [72] Jori, G.; Brown, S. B., *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, 3 (5), 403-405.
- [73] Schmidt, W., *Optical spectroscopy in chemistry and life sciences*. Wiley-VCH: Darmstadt, **2005**.
- [74] Dahl, T. A.; Midden, W. R.; Hartman, P. E., *Photochem. Photobiol. Sci.* **1987**, 46 (3), 345-352.
- [75] Winckler, K. D., *J. Photoch. Photobio. B* **2007**, 86 (1), 43-44.
- [76] (a) Spesia, M. B.; Lazzeri, D.; Pascual, L.; Rovera, M.; Durantini, E. N., *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2005**, 44 (3), 289-295; (b) Banfi, S.; Caruso, E.; Buccafurni, L.; Battini, V.; Zazzaron, S.; Barbieri, P.; Orlandi, V., *J. Photoch. Photobio. B* **2006**, 85 (1), 28-38; (c) Lazzeri, D.; Rovera, M.; Pascual, L.; Durantini, E. N., *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, 80 (2), 286-293; (d) Trannoy, L. L.; Terpstra, F. G.; de Korte, D.; Lagerberg, J. W. M.; Verhoeven, A. J.; Brand, A.; van Engelenburg, F. A. C., *Vox Sang.* **2006**, 91 (2), 111-118.
- [77] (a) Dai, T. H.; Tegos, G. P.; Lu, Z. S.; Huang, L. Y.; Zhiyentayev, T.; Franklin, M. J.; Baer, D. G.; Hamblin, M. R., *Antimicrob. Agents Ch.* **2009**, 53 (9), 3929-3934; (b) Mahdavi, H.; Kermani, Z.; Faghihi, G.; Asilian, A.; Hamishehkar, H.; Jamshidi, A.,

- Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* **2006**, 72 (6), 432-6; (c) Piraccini, B. M.; Rech, G.; Tosti, A., *J. Am. Acad. Dermatol.* **2008**, 59 (5), S75-S76; (d) Garcez, A. S.; Ribeiro, M. S.; Tegos, G. P.; Nunez, S. C.; Jorge, A. O. C.; Hamblin, M. R., *Laser Surg. Med.* **2007**, 39 (1), 59-66; (e) Smetana, Z.; Malik, Z.; Orenstein, A.; Mendelson, E.; BenHur, E., *Laser Surg. Med.* **1997**, 21 (4), 351-358.
- [78] Malik, Z.; Ladan, H.; Nitzan, Y., *J. Photoch. Photobio. B* **1992**, 14 (3), 262-266.
- [79] Maisch, T.; Szeimies, R. M.; Jori, G.; Abels, C., *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, 3 (10), 907-917.
- [80] Merchat, M.; Bertolini, G.; Giacomini, P.; Villanueva, A.; Jori, G., *J. Photoch. Photobio. B* **1996**, 32 (3), 153-157.
- [81] Bertoloni, G.; Rossi, F.; Valduga, G.; Jori, G.; Vanlier, J., *FEMS Microbiol. Lett.* **1990**, 71 (1-2), 149-155.
- [82] Nitzan, Y.; Balzam-Sudakevitz, A.; Ashkenazi, H., *J. Photoch. Photobio. B* **1998**, 42 (3), 211-218.
- [83] (a) Gad, F.; Zahra, T.; Francis, K. P.; Hasan, T.; Hamblin, M. R., *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, 3 (5), 451-458; (b) Schafer, M.; Schmitz, C.; Horneck, G., *Int. J. Rad. Biol.* **1998**, 74 (2), 249-253.
- [84] Maclean, M.; MacGregor, S.; Anderson, J. G.; Woolsey, G. A., *J. Photoch. Photobio. B* **2008**, 92 (3), 180-184.
- [85] Kim, S. Y.; Kwon, O. J.; Park, J. W., *Biochimie* **2001**, 83 (5), 437-444.
- [86] Jori, G., *J. Environ. Pathol. Toxicol.* **2006**, 25 (1-2), 505-519.
- [87] (a) Battioni, P.; Brigaud, O.; Desvaux, H.; Mansuy, D.; Traylor, T. G., *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32 (25), 2893-2896; (b) Pasetto, P.; Chen, X.; Drain, C. M.; Franck, R. W., *Chem. Commun.* **2001**, (1), 81-82; (c) Samaroo, D.; Soll, C. E.; Todaro, L. J.; Drain, C. M., *Org. Lett.* **2006**, 8 (22), 4985-4988.
- [88] Alves, E.; Costa, L.; Carvalho, C. M. B.; Tome, J. P. C.; Faustino, M. A.; Neves, M. G. P. M. S.; Tome, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, A.; Almeida, A., *BMC Microbiol.* **2009**, 9.
- [89] Barata, J. F. B. Estudos de síntese e reactividade de novos macrociclos de tipo corrol. Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro, Aveiro, **2004**.
- [90] Lakowicz, J. R., *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed.; Springer: New York, **2006**.
- [91] Valeur, B., *Molecular fluorescence: Principles and applications*. WILEY-VCH.

- [92] McNaught, A. D., Wilkinson, A., *IUPAC Compendium of chemical terminology*. 2nd ed.; Blackwell Scientific Publications: Oxford **1997**.
- [93] Vesterlund, S.; Paltta, J.; Laukova, A.; Karp, M.; Ouwehand, A. C., *J. Microbiol. Methods* **2004**, 57 (1), 23-31.
- [94] Nealson, K. H., *Trends Biochem. Sci.* **1979**, 4 (5), 105-110.
- [95] Nelson, D. L.; Cox, M. M., *Lehninger principles of biochemistry*. Fifth Edition ed.; Freeman: **2005**.
- [96] Alves, E.; Carvalho, C. M. B.; Tome, J. P. C.; Faustino, M. A. F.; Neves, M.; Tome, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, A.; Mendo, S.; Almeida, A., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, 35 (11), 1447-1454.
- [97] Demidova, T. N.; Gad, F.; Zahra, T.; Francis, K. P.; Hamblin, M. R., *J. Photoch. Photobio. B* **2005**, 81 (1), 15-25.
- [98] Alves, E. S. C. F. Fotoinativação de *escherichia coli* e de *enterococcus faecalis* por porfirinas livres e suportadas. Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro, Aveiro, **2007**.
- [99] Jemli, M.; Alouini, Z.; Sabbahi, S.; Gueddari, M., *J. Environ. Monit.* **2002**, 4 (4), 511-516.
- [100] Bendix, J.; Dmochowski, I. J.; Gray, H. B.; Mahammed, A.; Simkhovich, L.; Gross, Z., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39 (22), 4048-4051.